

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
31 mai 2001 (31.05.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/37819 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷: A61K 31/00

[FR/FR]; C.N.R.S., Station Biologique, B.P. 74, F-29682 Roscoff (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:

PCT/FR00/03264

(74) Mandataires: PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet Armengaud Ainé, 3, Avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international:

23 novembre 2000 (23.11.2000)

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) Langue de dépôt:

français

(26) Langue de publication:

français

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(30) Données relatives à la priorité:

99/14749 23 novembre 1999 (23.11.1999) FR

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

Publiée:

— Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(71) Déposant et

(72) Inventeur: EISENBRAND, Gerhard [DE/DE]; Gustav-Kirchhoff-strasse 3, 69126 Heidelberg (DE).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): MEIJER, Laurent [FR/FR]; 16, rue de Bir Hakeim, F-29680 Roscoff (FR). HOESSEL, Ralph [DE/DE]; Erlenbacher Strasse 128, 67659 Kaiserslautern (DE). THOMMET, Andréa



WO 01/37819 A2

(54) Title: USE OF INDIRUBINE DERIVATIVES FOR MAKING MEDICINES

(54) Titre: UTILISATION DE DERIVES D'INDIRUBINE POUR LA FABRICATION DE MEDICAMENTS

(57) Abstract: The invention concerns the use of indirubine derivatives for making medicines inhibiting GSK-3β. The invention is useful for treating pathologies involving GSK-3β and CDK5.

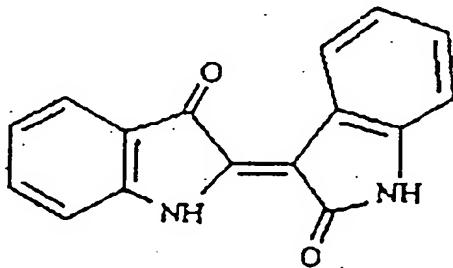
(57) Abrégé: L'invention vise l'utilisation pour la fabrication de médicaments inhibiteurs de la GSK-3β de dérivés d'indirubine. Application pour le traitement de pathologies impliquant GSK-3β et CDK5.

Utilisation de dérivés d'indirubine pour la fabrication
de médicaments.

L'invention a pour objet une nouvelle utilisation en
5 thérapeutique de dérivés d'indirubine.

L'indirubine appartient à la famille des indigoides. Le terme indigoïde est utilisé comme nom générique des colorants du groupe de l'indigo. Il s'agit de bis-indoles, dérivés de diverses sources naturelles par fermentation, oxydation et dimérisation
10 en présence de lumière.

L'indirubine (ou isoindigotine), répond à la formule A



Elle constitue le principe actif du Danggui Longhui
20 Wan, utilisé en médecine traditionnelle chinoise dans le
traitement de maladies chroniques, comme les leucémies.

Dans la demande EP 98 109 854.2, dans laquelle certains
des inventeurs de la demande sont co-inventeurs, on rapporte que
des dérivés d'indigoides, parmi lesquels l'indirubine et ses
25 dérivés, sont des inhibiteurs puissants des kinases cycline-
dépendantes (CDKs en abrégé), avec des IC₅₀ (dose inhibitrice à
50%) de 50 à 200 nM (voir également Hoessel et al., Nature Cell
Biology, vol 1, n°1, mai 1999). Ces kinases sont des régulateurs
clés du cycle cellulaire.

30 Les inhibiteurs entrent en compétition avec l'ATP pour
se lier à la sous-unité catalytique de la kinase.

Ces propriétés inhibitrices de CDKs, qui entraînent un
arrêt du cycle cellulaire, confèrent à ces dérivés d'indigoides

2

un intérêt pour le traitement de pathologies liées à la perte du contrôle de la prolifération comme les cancers, le psoriasis, les maladies cardiovasculaires, les maladies infectieuses, la néphrologie, les maladies neurodégénératives et les infections virales.

De manière surprenante, les inventeurs ont à présent mis en évidence que, parmi ces dérivés d'indigoides, seuls les dérivés d'indirubine exerçaient en outre un effet inhibiteur sur une autre cible enzymatique, constituée par la glycogène synthase kinase-3 β ou GSK-3 β en abrégé.

Cette kinase est un élément essentiel de la voie de signaux WNT. Elle est impliquée dans de multiples processus physiologiques: régulation du cycle cellulaire par contrôle de taux de cycline D1 et de β -caténine, formation dorso-ventrale durant le développement, action de l'insuline sur la synthèse de glycogène, excroissance axonale, neurotoxicité de HIV-1 à médiation par Tat, et autres.

De plus, on sait que la GSK-3 β et la CDK5 sont responsables pour une bonne part de l'hyperphosphorylation anormale de la protéine tau liant les microtubules comme observé dans les filaments appariés en hélice dans la maladie d'Alzheimer.

On mesure également l'intérêt de pouvoir disposer de dérivés inhibiteurs de l'activité de GSK-3 β pour favoriser la division cellulaire.

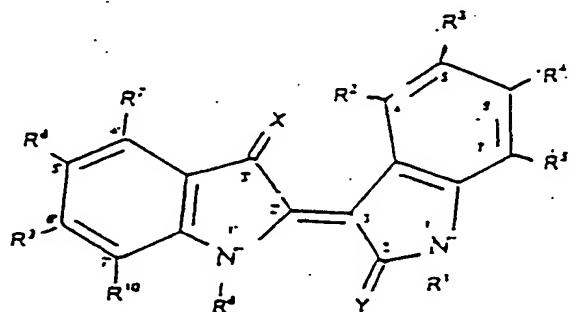
Or, les seuls inhibiteurs de la GSK-3 β connus à ce jour sont constitués par le lithium et certains dérivés de purine.

La sélectivité du lithium n'a pas été rapportée, mais étant donné la nature atomique du produit, il est vraisemblable qu'elle doit être très faible. De plus, le lithium n'agit qu'à des doses considérables (IC_{50} autour de 10 mM).

Il en est de même avec les dérivés de purine décrits dans la demande WO 98/16528, qui sont peu sélectifs et dont les IC₅₀ sont autour de 10 μM.

L'invention apporte une solution à ces problèmes avec l'utilisation d'indirubines de grande efficacité avec des IC₅₀ inférieures à 10 μM, et le plus généralement de l'ordre de 5 à 50 nM, pour la fabrication de médicaments inhibiteurs de GSK-3β.

Conformément à l'invention, pour la fabrication desdits médicaments, on utilise des dérivés d'indirubine répondant à la formule générale I :



15

dans laquelle R¹ et R⁶, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, un atome d'halogène; un groupe hydroxy; un groupe méthylènehydroxy; un radical alcoyle ou alkyloxy ou méthylènealkoxy, à chaîne droite ou ramifiée, en C1 à C18; un radical cycloalkyle ayant 3 à 7 atomes de carbone, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un radical aryle, aralkyle ou aryloxy, substitué ou non substitué, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe mono-, di- ou trialkylsilyle ayant 1 à 6 atomes de carbone, indépendamment l'un de l'autre, dans chaque cas, dans le groupe alkyle à chaîne droite ou ramifiée; un groupe mono-, di- ou triarylsilyle, avec des groupes aryle substitués ou non, indépendamment l'un de l'autre, dans chaque cas; un groupe trifluorométhyle; un groupe -COM; -COOM; ou -CH₂COOM, avec M représentant un atome d'hydrogène, un groupe alkyle en C1 à C18, à chaîne droite ou ramifiée, substituée le cas échéant par un ou plusieurs groupes

hydroxy et/ou amino, ou un groupe aryle comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes, pouvant être substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène, radicaux alkyle ou groupe alcoxy; un groupe

5 -NR¹¹R¹², dans lequel R¹¹ et R¹², identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, un radical alkyle à chaîne droite ou ramifiée, en C1 à C18, le cas échéant substitué en outre par un ou plusieurs groupes hydroxy et/ou amino, un groupe aryle, substitué ou non, comprenant le cas 10 échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe acyle; un groupe méthylèneamino -CH₂-NR¹¹R¹², dans lequel R¹¹ et R¹² présentent les significations ci-dessus; un groupe benzyle, dans lequel le noyau benzène comprend, le cas échéant, un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe méthylènecycloalkyle avec 3 à 7 atomes 15 de carbone, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un résidu d'acide aminé physiologique lié à l'azote, comme un amide; un O-glycoside ou un N-glycoside, dans lequel le glycoside est choisi parmi les monosaccharides ou les disaccharides; ou un groupe méthylènesulfonate; R², R³, R⁴, R⁵, 20 R⁷, R⁸, R⁹ et R¹⁰, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène; d'halogène; un groupe hydroxy; un groupe nitroso; un groupe nitro; un groupe alkoxy; un groupe alkyle à chaîne droite ou ramifiée, en C1 à C18, le cas échéant substitué par un ou plusieurs groupes hydroxy et/ou amino; un groupe aryle, 25 substitué ou non, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe aralkyle, substitué ou non, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe aryloxy, substitué ou non comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe méthylènearyloxy, substitué ou non, 30 comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe cycloalkyle, avec 3 à 7 atomes de carbone, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe méthylènecycloalkyle, avec 3 à 7 atomes de carbone, comprenant

le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe trifluorométhyle; un groupe -COM; -COOM; ou CH₂COOM, avec M représentant un atome d'hydrogène, un groupe alkyle en C1 à C18, à chaîne droite ou ramifiée, substituée le cas échéant en outre 5 par un ou plusieurs groupes hydroxy et/ou amino, ou un groupe aryle comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes, pouvant être substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène, groupes alkyle ou groupes alcoxy; un groupe -NR¹¹R¹², dans lequel R¹¹ et R¹², identiques ou différents, représentent un atome 10 d'hydrogène, un radical alkyle à chaîne droite ou ramifiée, en C1 à C18, le cas échéant substitué en outre par un ou plusieurs groupes hydroxy et/ou amino, un groupe aryle substitué ou non, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes, un groupe acyle, ou dans lequel l'atome d'azote fait partie d'un 15 groupe cycloalkyle ayant 3 à 7 atomes de carbone, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe -CONR¹¹R¹², dans lequel R¹¹ et R¹² présentent les significations ci-dessus; un groupe hydroxylamino; un groupe phosphate; un groupe phosphonate; un groupe sulfate; un groupe sulfonate; un groupe 20 sulfonamide; un groupe -SO₂NR¹¹R¹², dans lequel R¹¹ et R¹² présentent les significations données ci-dessus; un groupe azo -N=N-R¹³, dans lequel R¹³ représente un groupe aromatique, le cas échéant substitué par un ou plusieurs groupes carboxyle, phosphoryle ou sulfonate, ou un groupe O-glycoside ou N- 25 glycoside, dans lequel le glycoside est choisi parmi les monosaccharides ou les dissacharides; ou R¹ et R⁵, et R⁶ et R¹⁰, respectivement, forment ensemble, indépendamment l'un de l'autre, un cycle ayant 1 à 4 groupes CH₂, le cas échéant substitué; et X et Y, identiques ou différents, représentent un 30 atome d'oxygène; de soufre; de sélénium; de tellurium; un groupe -NR¹⁴, dans lequel R¹⁴ représente un atome d'hydrogène, un groupe alkyle, à chaîne droite ou ramifiée, en C1 à C18, le cas échéant substitué par un ou plusieurs groupes carboxyle, phosphoryle ou

sulfonate, un groupe aryle substitué ou non, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes, un groupe aralkyle, ou un groupe sulfonate; ou -NOR¹⁴, dans lequel le groupe R¹⁴ présente les significations données ci-dessus,

5 et les sels de ces dérivés physiologiquement acceptables.

Dans une disposition de l'invention, un ou plusieurs atomes d'un ou plusieurs cycles benzéniques sont remplacés par des atomes d'azote.

Dans une autre disposition, un ou plusieurs systèmes cycliques aromatiques ou non aromatiques, qui comprennent, le cas échéant, un ou plusieurs hétéroatomes indépendamment l'un de l'autre, sont condensés au système indirubine.

Dans encore une autre disposition, les dérivés d'indirubine de formule (I) sont liés à un ester de polyéthylèneglycol ou à un éther de polyéthylèneglycol par des liaisons, respectivement, ester ou éther.

L'invention vise plus spécialement les dérivés d'indirubine possédant une IC₅₀ vis-à-vis de GSK-3β inférieure à 10 μM et de préférence à 1 μM, et notamment ceux avec une IC₅₀ 20 inférieure à 50 nM.

De manière préférée, dans de tels dérivés, X et Y, identiques ou différents, représentent un groupe = O ou = NOH.

Dans les familles correspondantes, les substituants R¹, R³, R⁴ et R⁸ présentent avantageusement les significations suivantes:

- R³: un atome d'hydrogène, d'halogène, un radical alkyle, un groupe -SO₃H, -SO₂NH₂, -SO₂-N-(CH₃)₂, -SO₂-N-C₂H₅-OH, -SO₂-N-(C₂H₅-OH)₂, -SO₂-NH-CH₃,

30 - R⁴ et R⁸, indépendamment l'un de l'autre : un atome d'hydrogène ou d'halogène,

- R¹: un radical alkyle ou aryle, les autres substituants donnés sur la formule (I) représentant un atome d'hydrogène.

7
Dans une famille préférée selon l'invention,
 $X = Y$, ces deux substituants représentant un groupe = O.

Des dérivés de cette famille constituant des inhibiteurs de GSK-3 β de grande efficacité, avec des IC₅₀ inférieures à 5 μ M, le plus généralement à 1 μ M, voire à 50 nM, comprennent avantageusement des substituants R¹, R³, R⁴ et R⁸ répondant aux significations suivantes :

- R¹: alkyle, notamment méthyle, et phényle,
- R³: hydrogène, halogène (F, Cl, Br, I), NO₂,
- 10 - SO₃H, -SO₂NH₂, -SO₂-N(CH₃)₂, -SO₂-N-C₂H₅-OH, -SO₂-N-(C₂H₅-OH)₂,
- SO₂-NHCH₃,

15 -R⁴ et R⁸: halogène, en particulier I ou Br,
les autres substituants donnés dans la formule (I) représentant un atome d'hydrogène.

Des dérivés particulièrement préférés sont choisis parmi l'indirubine, la 5-iodo-indirubine, la 5-bromo-indirubine, la 5-chloro-indirubine, la 5-fluoro-indirubine, la 5-méthyl-indirubine, la 5-nitro-indirubine, la 5-SO₃H-indirubine, la 5'-bromo-indirubine, la 5-5'-dibromo-indirubine ou l'acide 5'-bromo-indirubine 5-sulfonique.

Dans une autre famille préférée selon l'invention, X représente un groupe = NOH et Y un groupe = O.

Dans un groupe préféré de cette famille, R³ représente un atome d'halogène, notamment I, ou un groupe 25 -SO₃Na.

Les dérivés correspondants présentent avantageusement une IC₅₀ vis-à-vis de GSK-3 β inférieure à 100 nM, et même pour nombre d'entre eux inférieure à 50 nM.

Des dérivés préférés de ce groupe sont choisis parmi 30 l'indirubine-3'-monoxime, la 5-iodo-indirubine-3'-monoxime et la 5-SO₃Na-indirubine-3'-monoxime.

Comme indiqué plus haut, les dérivés définis ci-dessus, ont déjà été décrits comme inhibiteurs des CDKs, ainsi que

d'autres indigoides dérivés par exemple de l'indigo ou de l'isoindigo. Or de manière surprenante, seuls les dérivés d'indirubine exercent en outre un effet inhibiteur vis-à-vis de GSK-3 β .

5 Cet effet est le plus généralement du même ordre de grandeur vis-à-vis des CDKs et de la GSK-3 β .

Les médicaments fabriqués conformément à l'invention en utilisant les dérivés d'indirubine définis ci-dessus sont utilisables pour le traitement des pathologies dans lesquelles 10 la GSK-3 β est impliquée.

Il en est ainsi par exemple des diabètes, où les inhibiteurs de GSK-3 β sont utilisables comme insulino-mimétiques. On rappelle que l'insuline agit par une cascade d'événements biochimiques conduisant à une inhibition de la GSK-3 β et que 15 cette inhibition est responsable de la réponse des cellules à l'insuline.

De même, ces médicaments présentent un grand intérêt pour le traitement de maladies neurodégénératives. Comme démontré dans les exemples, l'hyperphosphorylation de la 20 protéine tau provoquée par CDK5 et GSK-3 β peut être en effet inhibée par les dérivés d'indirubine. En administrant les médicaments fabriqués selon l'invention, il est alors possible, grâce à leur effet inhibiteur à la fois de CDK5 et de GSK-3 β , 25 d'empêcher l'hyperphosphorylation de la protéine tau chez les malades d'Alzheimer et de lutter contre la neurodégénérescence.

Ces médicaments trouvent également une application de grand intérêt pour le traitement de maladies maniaco-dépressives.

On citera également leur utilisation pour le traitement 30 de cancers où leur effet inhibiteur à la fois de GSK-3 β et de CDK5, qui se traduit par l'apoptose de la cellule tumorale, est avantageusement mis à profit.

Ces médicaments s'avèrent également efficaces pour le traitement de maladies provoquées par des parasites unicellulaires comme la malaria, les trypanosomes, les leishmanias, les toxoplasmes, les pneumocystis et autres, ou des parasites pluricellulaires, comme les champignons et les vers.

Lors de l'élaboration des médicaments, les principes actifs, utilisés en quantités thérapeutiquement efficaces, sont mélangés avec les véhicules pharmaceutiquement acceptables pour le mode d'administration choisi.

Ainsi pour une administration par voie orale, les médicaments sont préparés sous forme de gélules, comprimés, dragées, capsules, pilules, gouttes et analogues. De tels médicaments peuvent renfermer de 1 à 100 mg de principe actif par unité.

Pour l'administration par voie injectable (intraveineuse, sous-cutanée, intramusculaire), les médicaments se présentent sous forme de solutions stériles ou stérilisables. Les doses par unité de prise peuvent varier de 1 à 50 mg de principe actif. La posologie quotidienne est choisie de manière à obtenir une concentration finale d'au plus 100 μ M en dérivé d'indirubine dans le sang du patient traité.

Afin d'illustrer l'invention, sans toutefois en limiter sa portée, on rapporte dans les exemples qui suivent d'autres caractéristiques et avantages.

Dans ces exemples, il sera fait référence aux figures 1 à 3, qui représentent respectivement,

- les figures 1A à 1C, les effets inhibiteurs d'indirubines utilisées selon l'invention vis-à-vis de GSK-3 β , CDK5/p25 et CDK1/cycline B,
- la figure 2, l'effet compétiteur avec ATP pour la fixation à GSK-3 β , et
- la figure 3, l'effet inhibiteur par les indirubines, *in vitro*, de la phosphorylation de tau par GSK-3 β .

10

• Caractérisation des indirubines

Les analyses élémentaires ont été effectuées à l'aide d'un appareil d'analyse élémentaire de CHN Perkin-Elmer 2400. Les spectres de RMN¹H ont été enregistrés à 400 MHz, de RMN ¹³C à 100 MHz sur un appareil Bruker AMX 400, avec comme référence interne du tétraméthylsilane. s désigne un singulet, d, un doublet et m, un multiplet. Les spectres de masse ont été pris selon le mode d'ions positifs sous impact électronique (EI 70) et avec un appareil Finigan MAT 90.

10

• Exemples de synthèses d'indirubines

indirubine

L'indirubine est préparée selon Russell et al, J.Am.Chem.Soc.1969, 91, 3851-3859 (méthode modifiée) en utilisant 1,76 g (12,0 mmole) d'isatine et 2,00 g (11,4 mmole) d'indoxylacétate. Après filtration, le résidu est lavé 2 fois avec du méthanol, et plusieurs fois avec de l'eau froide, jusqu'à neutralité du filtrat. Le produit est séché sur KOH. On obtient 2,42 g (81,0%) de cristaux violet sombre R_f = 0,64 (acétate d'éthyle hexane 1/1 v/v); PF 341-343 °C : ¹H-RMN (DMSO-d₆) δ 6,91 (d, J = 8,1, C7H), 7,02 (m, C5H et C5'H), 7,26 (m, C6H), 7,42 (d, J = 8,1, C7'H), 7,58 (m C6'H), 7,66 (d, J = C4'H), 8,77 (d, J = 7,7, C4H), 11,01 (s) et 10,88 (s) (N1H et N1'H); ¹³C-RMN (DMSO-d₆, 90°C) δ 106,97 (s, C3), 109,57 (d, J = 162,2, C7), 113,15 (d, J = 168,7, C7'), 119,37 (s, C3a'), 121,21 (d, J = 162,1, Hz) et 121,19 (d, J = 162,1 Hz) (C5 et C5'), 121,58 (s, C3a), 124,62 (d, J = 164,6, Hz) et 124,20 (d, J = 163,8, Hz) (C6 et C4'), 129,15 (d, J = 159,8, C4), 136,85 (d, J = 161,4, C6'), 138,48 (s, C7a), 141,07 (s, C7a'), 152,35 (s, C2'), 171,11 (s, C2), 188,27 (s, C3'); MS m/e 262 (M⁺, 100), 234 (43), 205 (25), 131 (4). Anal. (C₁₆H₁₀N₂O₂) C, H, N.

5-iodoindirubine

II

On procède comme décrit pour l'indirubine. En partant de 655 mg de 5-iodoisatine (2,40 mmole) et de 399 mg d'indoxylacétate (2,28 mmole), la réaction conduit à 720 mg de produit brut. Par recristallisation à partir d'éthanol, on obtient 58 mg (6,2 %) de cristaux violet sombre ; $R_f = 0,68$ (acétate d'éthyle/hexane 1/1 v/v) ; PF 334-335 °C : ^1H -RMN (DMSO-d₆) δ 6,75 (d, $J = 8,1$, C7H), 7,04 (m, C5'H), 7,42 (d, $J = 8,1$, C7'H), 7,57 (m, C6H et C6'H), 7,65 (d, $J = 7,5$, C4'H), 9,11 (s, C4H), 11,00 (s) et 11,09 (s) (N1H et N1'H) ; ^{13}C -RMN (DMSO -d₆, 90°C) δ 83,73 (d, $J = 16,9$, C5), 105,18 (s, C3), 111,85 (d, $J = 164,6$, C7), 113,43 (d, $J = 167,2$, C7'), 119,27 (s, C3a'), 121,65 (d, $J = 163,6$, C5'), 124,03 (s, C3a), 124,44 (d, $J = 163,9$, Hz, C4'), 132,49 (d, $J = 171,2$, C6), 137,00 (d, $J = 166,9$, Hz) et 137,15 (d, $J = 160,1$ Hz) (C4 et C6'), 139,26 (s, C7a'), 140,44 (s, C7a), 152,41 (s, C2'), 170,48 (s, C2), 188,54 (s, C3') ; MS m/e 388 (M⁺, 100), 360 (3), 261 (6), 233 (16), 205 (16). Anal. ($\text{C}_{16}\text{H}_9\text{IN}_2\text{O}_2$) C, H, N.

5-bromoindirubine

On procède comme décrit pour l'indirubine. En partant de 1,30 g de 5-bromoisatine (5,75 mmole) et de 1,00 g d'indoxylacétate (5,71 mmole), le produit brut est recristallisé à partir de pyridine et conduit à 1,16 g (59,3 %) de cristaux noirs avec une nuance violette; $R_f = 0,49$ (acétate d'éthyle hexane 1/1 v/v) : ^1H -RMN (DMSO-d₆) δ 6,86 (d, $J = 8,4$, C7H), 7,05 (pt, C5'H), 7,41-7,31 (m, C6H et C7'H), 7,59 (m, C6'H), 7,66 (d, $J = 7,5$, C4'H), 8,94 (s, C4H), 11,10 (s) et 11,00 (s) (N1H et N1'H) ; ^{13}C -RMN (DMSO -d₆, 90°C) δ 104,92 (s, C3), 111,24 (d, $J = 165,1$, C7), 112,89 (s, C5), 113,53 (d, $J = 167,8$, C7'), 118,92 (s, C3a'), 121,64 (d, $J = 164,4$, C5'), 123,41 (s, C3a), 124,49 (d, $J = 164,0$, C4'), 126,60 (d, $J = 171,3$, C6), 131,03 (d, 167,1, C4), 137,29 (d, $J = 160,9$, C6'), 139,16 (s, C7a'), 139,74 (s, C7a), 152,42 (s, C2'), 170,50 (s, C2), 188,77 (s, C3') ; MS m/e 342 (M⁺, 100), 340 (M⁺, 100), 314 (18), 312 (18), 261 (7). Anal. ($\text{C}_{16}\text{H}_9\text{BrN}_2\text{O}_2$) C, H, N.

5-chloroindirubine

On opère comme décrit pour l'indirubine. En partant de 500 mg de 5-chloroisatine (2,75 mmole) et de 480 mg d'indoxylacétate (2,73 mmole), on obtient 766 mg (94,6 %) d'une poudre violette, R_f = 0,60 (acétate d'éthyle /hexane 1/1 v/v) : ^1H -RMN (DMSO-d₆) δ 6,89 (d, J = 8,3, C7H), 7,04 (m, C5'H), 7,27 (d, J = 8,3, C6'H), 7,42 (d, J = 7,8, C7'H), 7,58 (m, C6'H), 7,65 (d, J = 7,6, C4'H), 8,78 (s, C4H), 10,99 (s) et 11,09 (s) (N1H et N1'H); ^{13}C -RMN (DMSO-d₆) δ 104,95 (s, C3), 110,61 (d, J = 164,6, C7), 113,50 (d, J = 168,6, C7'), 118,85 (s, C3a'), 121,54 (d, J = 165,4, C5'), 122,85 (s, C3a), 123,76 (d, J = 170,2 Hz) et 124,41 (d, J = 163,8 Hz) (C6 et C4'), 125,00 (s, C5), 128,16 (d, J = 167,0, C4), 137,21 (d, J = 159,8, C6'), 139,10 (s) et 139,31 (s) (C7a et C7a'), 152,39 (s, C2'), 170,52 (s, C2), 188,72 (s, C3'); MS m/e 296 (M⁺, 100), 268 (39), 233 (35), 205 (50). Anal. (C₁₆H₉CIN₂O₂) C, H, N.

5-fluororoindirubine

On procède comme décrit pour l'indirubine. En partant de 500 mg de 5-fluoroisatine (3,03 mmole) et de 530 mg d'indoxylacétate (3,00 mmole), on obtient 776 mg (92,4 %) d'une poudre violette, R_f = 0,32 (acétate d'éthyle/ hexane 1/2 v/v): ^1H -RMN (DMSO-d₆) δ 6,87 (dd, $J_{H,H}$ = 8,3, $J_{H,H}$ = 4,7 C7H), 7,10-7,01 (m, C6H et C5'H), 7,42 (d, J = 8,2, C7'H), 7,58 (pt, C6'H), 7,65 (d, J = 7,4, C4'H), 8,56 (d, $J_{F,H}$ = 10,6, C4H), 11,00 (b, N1H et N1'H); ^{13}C -RMN (DMSO-d₆) δ 105,93 (s, C3), 110,13 (dd, $J_{C,H}$ = 163,5, $J_{C,F}$ = 8,7, C7), 111,34 (dd, $J_{C,H}$ = 169,3, $J_{C,F}$ = 27,6, C6), 113,57 (d, J = 162,0, C7'), 115,24 (dd, $J_{C,H}$ = 188,9, $J_{C,F}$ = 24,7, C4), 118,98 (s, C3a'), 121,64 (d, J = 164,2, C5'), 122,41 (d, $J_{C,F}$ = 10,8, C3a), 124,56 (d, J = 163,5, C4'), 137,31 (s, C7a) 137,36 (d, J = 162,8, C6'), 139,12 (s, C7a') 152,60 (s, C2'), 157,40 (d, $J_{C,F}$ = 233,2, C5), 171,02 (s, C2), 188,96 (s, C3'); MS m/e 280 (M⁺, 100), 252 (73), 223 (32). Anal. (C₁₆H₉FN₂O₂) C, H, N.

5-méthylindirubine

13

On opère comme décrit pour l'indirubine. En partant de 500 mg de 5-méthylisatine (3,10 mmole) et 540 mg d'indoxylacétate (3,07 mmole), on obtient 781 mg (92,0 %) d'une poudre violette, $R_f = 0,44$ (acétate d'éthyle/hexane 1/2 v/v) : $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-d₆) δ 2,33 (s, CH₃), 7,08-7,0 (m, C6H et C5'H), 6,79 (d, $J = 7,9$, C7H), 7,42 (d, $J = 7,9$, C7'H), 7,58 (pt, C6'H), 7,64 (d, $J = 7,6$, C4'H), 8,63 (s, C4H), 10,79 (s) et 11,00 (s) (N1H et N1'H); $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO-d₆) δ 20,99 (q, $J = 126,5$, CH₃), 106,79 (s, C3), 109,17 (d, $J = 161,3$, C7), 113,33 (d, $J = 168,5$, C7'), 119,94 (s, C3a'), 121,09 (d, $J = 164,4$, C5') 121,45 (s, C3a), 124,19 (d, $J = 163,7$, C4'), 125,11 (d, $J = 164,4$, C6), 129,72 (d, $J = 157,4$, C4), 129,72 (s, C5) 136,96 (d, $J = 161,6$, C6'), 138,08 (s) et 138,65 (s) (C7a et C7a'), 152,38 (s, C2'), 171,93 (s, C2), 188,49 (s, C3'); MS m/e 276 (M⁺, 100), 261 (10), 248 (47), 247 (53). Anal. (C₁₇H₁₂N₂O₂) C, H, N.

5-nitroindirubine

On procède comme décrit pour l'indirubine. En partant de 1,00 g de 5-nitroisatine (5,20 mmole) et 900 mg d'indoxylacétate (5,14 mmole), on obtient 1,39 g (88,2 %) d'une poudre violette, $R_f = 0,16$ (d'éthyle acétate/hexane 1/2 v/v) : $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-d₆) δ 7,01 (d, $J = 8,7$, C7H), 7,05 (pt, C5'H), 7,40 (d, $J = 8,1$, C7'), 7,58 (pt, C6'H), 7,64 (d, $J = 7,5$, C4'H), 8,13 (d, $J = 8,7$, C6H), 9,60 (s, C4H), 11,15 (s) et 11,49 (s) (N1H et N1'H); $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO-d₆) δ 103,51 (s, C3), 109,27 (d, $J = 167,8$, C7), 113,68 (d, $J = 167,8$, C7'), 118,83 (s, C3a'), 119,48 (d, $J = 167,8$, C6) 121,59 (s, C3a), 121,97 (d, $J = 163,0$, C5'), 124,60 (d) et 124,69 (d) (C4 et C4'), 137,37 (d, $J = 161,6$, C6'), 139,97 (s, C5) 136,96 (d, $J = 161,6$, C6'), 138, (s) et 138,65 (s, C7a'), 141,63 (s, C5), 145,71 (s, C7a), 152,38 (s, C2'), 170,93 (s, C2), 188,78 (s, C3'); MS m/e 307 (M⁺, 100), 276 (10), 262 (100), 234 (23). Anal. (C₁₆H₉N₃O₄) C, H, N.

acide indirubine-5-sulfonique (sel de sodium)

14

On opère comme décrit pour l'indirubine. En partant de 250 mg du sel de sodium dihydraté de l'acide isatine-5-sulfonique (1,00 mmole) et de 170 mg d'indoxylacétate (0,971 mmole), on obtient 258 mg (70,8 %) d'un solide violet, $R_f = 0,73$ (éthanol): $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-d₆) δ 6,84 (d, $J = 8,0$, C7H), 7,04 (m, C5'H), 7,43 (d, $J = 8,0$, C7'H), 7,54-7,61 (m, C4'H et C6'H), 7,67 (d, $J = 7,4$, C6H), 9,13 (s, C4H), 10,99 (s) et 11,05 (s) (N1H et N1'H); $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO-d₆) δ 106,25 (s, C3), 108,20 (d, $J = 163,3$, C7), 113,39 (d, $J = 168,6$, C7'), 120,50 (s) et 118,98 (s) (C3a et C3a'), 121,28 (d, $J = 157,9$ C5') 122,57
 (d, $J = 169,4$, C6), 124,27 (d, $J = 165,6$, C4'), 126,83
 (d, $J = 163,3$, C4), 137,02 (d, $J = 161,0$, C6'), 138,45 (s, C5), 140,89 (s) et 141,64 (s) (C7a et C7a'), 152,39 (s, C2'), 171,14 (s, C2), 188,33 (s, C3'). Anal. ($\text{C}_{16}\text{H}_9\text{N}_2\text{NaO}_5\text{S}$ 1,5 H₂O) C, H, N.

5'-bromoindirubine

On opère comme décrit pour l'indirubine. En partant de 59 mg d'isatine (0,40 mmole) et de 100 mg de 5-bromo-indoxylacétate (0,394 mmole), on obtient 123 mg (92,6 %) d'une poudre violette, $R_f = 0,59$ (acétate d'éthyle/hexane 1/1 v/v): $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-d₆) δ 6,89 (d, $J = 7,8$, C7H), 7,02 (pt, C5H), 7,26 (pt, C6H), 7,39 (d, $J = 8,5$, C7'H), 7,71 (d, $J = 8,5$, C6'H), 7,76 (s, C4'H), 8,73 (d, $J = 7,8$, C4H), 10,89 (s) et 11,08 (s) (N1H et N1'H); $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO-d₆) δ 107,43 (s, C3), 109,54 (d, $J = 161,4$, C7), 112,63 (s, C5'), 115,49 (d, $J = 169,4$, C7'), 120,64 (s) et 121,20 (s) (C3a et C3a'), 121,20 (d, $J = 160,0$ C5) 124,69 (d, $J = 154,5$, C6), 126,31 (d, $J = 163,0$, C4'), 129,56 (d, $J = 159,0$, C4), 137,69 (s, C7a') 138,87 (d, $J = 166,1$, C6'), 141,05 (s, C7a), 151,23 (s, C2'), 170,64 (s, C2), 187,15 (s, C3'); MS m/e 342 (M⁺, 100), 340 (M⁺, 100), 314 (16), 312 (16), 261 (1), 233 (44). Anal. ($\text{C}_{16}\text{H}_9\text{BrN}_2\text{O}_2$) H, N, C: calc, 56,3; trouvé, 55,7.

5,5'-dibromoindirubine

On procède comme décrit pour l'indirubine. En partant de 89 mg de 5-bromo-isatine (0,39 mmole) et de 100 mg de 5-bromo-

15

indoxylacétate (0,394 mmole), on obtient 154 mg (94,0 %) d'une poudre violette: $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-d₆) δ 6,84 (d, $J = 8,1$, C7H), 7,42-7,36 (m, C6H et C7'H), 7,71 (d, $J = 8,5$, C6'H), 7,76 (s, C4'H), 8,88 (s, C4H), 11,01 (s) et 11,16 (s) (N1H et N1'H); MS m/e 422 (M⁺, 47), 420 (M⁺, 100), 418 (M⁺, 48), 394 (3), 392 (7), 390 (3), 342 (25), 340 (25), 313 (15), 311 (15). Anal. ($\text{C}_{16}\text{H}_8\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}_2$) C, H, N.

acide 5'-bromoindirubine-5-sulfonique (sel de sodium)

On procède comme décrit pour l'indirubine. En partant de 224 mg de sel de sodium dihydraté de l'acide isatine-5-sulfonique (0,787 mmole) et de 190 mg de 5-bromo-indoxylacétate (0,748 mmole), on obtient 204 mg (56,9 %) d'une poudre violette: $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-d₆) δ 6,82 (d, $J = 8,0$, C7H), 7,40 (d, $J = 8,5$, C7'H), 7,55 (d, $J = 8,0$, C6H), 7,73 (d, $J = 8,5$, C6'H), 7,79 (s, C4'H), 9,09 (s, C4H), 11,11 (b, N1H et N1'H). Anal. ($\text{C}_{16}\text{H}_8\text{Br}_2\text{N}_2\text{NaO}_5\text{S}_2\text{H}_2\text{O}$) H, N, C: calc, 40,1 ; trouvé 39,6.

indirubine-3'-monoxime

On prépare ce composé comme décrit Farbwerke vorm. Meister Lucius & Brüning in Hoechst a.M. Verfahren zur Herstellung von Derivaten der Indirubine. DRP 283726. Le produit brut est recristallisé à partir d'éthanol/eau (7/2, v/v). On obtient le composé recherché sous forme de cristaux rouge sombre, $R_f = 0,55$ (acétate d'éthyle/hexane 1/1 v/v): $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-d₆) δ 6,90 (d, $J = 7,9$, C7H), 7,42 (d, $J = 7,9$, C7'H), 7,58 (pt, C6'H), 7,64 (d, $J = 7,6$, C7H), 6,95 (m, C5H), 7,03 (m, C5'H), 7,13 (m, C6H), 7,41 (m, C6'H et C7'H), 8,24 (d, $J = 7,2$, C4H), 8,65 (d, $J = 7,2$, C4H), 10,72 (s) et 11,73 (s) (N1H et N1'H), 13,48 (s, NOH); $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO-d₆) δ 98,88 (s, C3), 108,91 (d, $J = 162,3$, C7), 111,52 (d, $J = 165,8$, C7'), 116,54 (s, C3a'), 120,43 (d, 160,2, C5'), 121,49 (d, $J = 161,6$, C5), 122,66 (s, C3a), 123,09 (d, $J = 165,1$, C6), 125,92 (d, $J = 154,0$, C4), 127,95 (d, $J = 164,4$, C4'), 132,02 (d, $J = 159,5$, C6'), 138,34 (s, C7a), 144,83 (s, C7a'), 145,32 (s, C2'), 151,22 (s, C3'), 170,95 (s, C2); MS m/e

16

277 (M^+ , 100 %), 260 (87 %), 247 (24 %), 220 (14 %), 205 (11).

Anal. ($C_{16}H_{11}N_3O_2$ 0,25 H_2O) C, H, N.

5-iodoindirubine-3'-oxime

On opère comme décrit pour l'indirubine-3'-monoxime. En partant de 250 mg d'indirubine-3'-monoxime (0,644 mmole) et de 175 mg de chlorhydrate d'hydroxylamine (2,52 mmole) dans 7,5 ml de pyridine, on obtient un précipité. Le produit brut est lavé avec de l'eau et recristallisé à partir d'éthanol. On obtient 119 mg (45,9 %) de cristaux rouge, R_f = 8,50 (d'acétate éthyle/hexane 1/1 v/v); 1H -RMN (DMSO-d₆) δ 6,73 (d, J = 6,7, C7H), 7,09-7,01 (m, C5'H), 7,44-7,40 (m, C6, C6'H, et C7'H), 8,26 (d, J = 7,6, C4'H), 8,90 (s, C4H), 10,79 (s) et 11,88 (s) (N1H et N1'H), 13,68 (s, NOH); ^{13}C -RMN (DMSO-d₆) δ 83,69 (s, C5), 96,59 (s, C3), 110,89 (d, C7), 111,51 (d, C7'), 116,44 (s, C3a'), 121,77 (d, C5') 125,40 (s, C3a), 127,42 (d, C4'), 130,00 (d, C6), 131,52 (d, C6'), 133,40 (d, C4), 137,20 (s, C7a), 144,01 (s, C7a'), 146,68 (s, C2'), 151,52 (s, C3'), 170,25 (s, C2); MS m/e 403 (M^+ , 100), 387 (9), 373 (10), 276 (5), 260 (46). Anal. ($C_{17}H_{12}N_2O_2$) C, H, N.

6-iodoindirubine

On opère comme décrit pour l'indirubine. En partant de 250 mg de 6-iodoisatine (0,92 mmole) et de 120 mg d'indoxylacétate (0,69 mmole), on obtient 182 mg (68,0 %) d'une poudre violette, R_f = 0,47 (acétate d'éthyle/hexane 1/1 v/v); 1H -RMN (DMSO-d₆) δ 7,01 (pt, J = 7,5, C5'H), 7,19 (s, C7H), 7,38 (m, C5H et C7'H), 7,56 (pt, J = 7,3, C6'H), 7,62 (d, J = 7,6, C4'H), 8,49 (d, J = 8,3, C4H), 10,93 (s) et 11,03 (s) (N1H et N1'H); ^{13}C -RMN (DMSO-d₆) δ 94,60 (d, J = 10,4, C6), 105,57 (s, C3), 113,71 (d, J = 169,5, C7'), 118,05 (d, J = 167,1, C4'), 119,17 (s, C3a'), 121,24 (s, C3a), 121,65 (d, J = 163,4, C7), 124,56 (d, J = 163,4, C5'), 126,17 (d, J = 167,1, C4), 129,99 (d, J = 167,5, C5), 137,29 (d, J = 161,0, C6'), 139,07 (s, C7a'), 142,12 (s, C7a), 152,56 (s, C2'), 170,70 (s, C2), 188,83 (s, C3'); MS m/e 388 (M^+ , 100), 360 (9), 261 (15), 233 (53), 205

17

(53), 127 (2). Anal. ($C_{16}H_9IN_2O_2$) H, N. C : calc, 49,5 %; trouvé 48,5 %.

1-méthylindirubine

On procède comme décrit pour l'indirubine. En partant de 200 mg de 1-méthylisatine (1,24 mmole) et 217 mg d'indoxylacétate (1,24 mmole), le produit brut est recristallisé à partir de pyridine et sublimé (140°C, sous vide), on obtient 195 mg (56,9 %) de billes claires légèrement violettes violettes; $R_f = 0,88$ (acétate d'éthyle/hexane 3/2 v/v: 1H -RMN (DMSO-d₆) δ 3,29 (s, CH₃), 7,02-7,12 (m, C5H, C7H, et C5'H), 7,35 (pt, C6H), 7,43 (d, $J = 8,3$, C7'H), 7,59 (pt, C6'H), 7,67 (d, $J = 7,6$, C4'H), 8,81 (d, $J = 7,3$, C4H), 11,07 (s, N1'H); MS m/e 276 (M⁺, 100), 248 (25), 247 (54). Anal. ($C_{17}H_{12}N_2O_2$) C, H, N.

1-phénylindirubine

On procède comme décrit pour l'indirubine. En partant de 500 mg de 1-phénylesatine (2,24 mmole) et de 334 mg d'indoxylacétate (1,90 mmole), on obtient 597 mg (92,6 %) d'une poudre violette, $R_f = 0,92$ (acétate d'éthyle/hexane 1/1 v/v) : 1H -RMN (DMSO-d₆) δ 6,83 (pt, $J = 7,3$, C7H), 7,05 (pt, C5'H), 7,16 (pt, C5H), 7,29 (pt, C6H), 7,42 (d, $J = 8,0$, C7'H), 7,53-7,48 (m) et 7,64-7,58 (m) (C6'H et 5 phényl-H, 7,69 (d, $J = 7,3$, C4'H), 8,92 (d, $J = 7,6$, C4H), 11,17 (s, N1'H); ^{13}C -RMN (DMSO-d₆) δ 104,96 (s, C3), 108,71 (s, C7), 113,48 (s, C7'), 118,96 (s, C3a'), 120,80 (s, C3a), 121,50 (d, $J = 159,1$, Hz), et 122,34 (d, $J_{C,H} = 160,8$, Hz), (C5 et C5'), 124,44 (d) et 124,56 (d) (C6 et C4'), 126,75 (d, $J = 161,5$, C3"et C5"), 127,93 (d, $J = 161,5$, Hz) et 128,99 (d, $J = 160,8$ Hz) (C4 et C4"), 129,46 (d, $J = 161,5$, C2"et C6"), 137,18 (d, $J = 161,6$, C6'), 139,11 (s) et 133,97 (s) (C7a' et C1"), 141,34 (s, C7a), 152,32 (s, C2'), 168,36 (s, C2), 188,44 (s, C3'); MS m/e 388 (M⁺, 100), 311 (13), 310 (58), 309 (39) Anal. ($C_{22}H_{14}N_2O_2$) C, H, N.

acide 3'-hydroxyiminoidirubine-5-sulfonique (sel de sodium)

On opère selon Lucius et al ci-dessus (méthode modifiée) avec 500 mg de sel de sodium de l'acide indirubine-5-sulfonique (0,644 mmole) et 400 mg de chlorhydrate d'hydroxylamine (5,76 mmole) dans 15 ml de pyridine. Le précipité produit en ajoutant 5 100 ml d'acide chlorhydrique et 20 ml d'une solution saturé de chlorure de sodium au mélange réactionnel est combiné au précipité obtenu à partir du filtrat, qui a été produit en ajoutant 15 ml d'une solution saturé de chlorure de sodium. Ce produit brut est recristallisé à partir d'eau. On obtient 170 mg 10 (34,0 %) de plaquettes noires à écailles, à nuance rouge, $R_f = 0,76$ (éthanol) : $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-d₆) δ 6,82 (d, $J = 8,1$, C7H), 7,10-6,97 (m, C5'H), 7,41-7,39 (m, C6' et C7'), 7,48 (d, $J = 7,9$, C6H), 8,26 (d, $J = 7,7$, C4'H), 8,92 (s, C4H), 10,82 (s) et 11,80 (s) (N1H et N1'H), 13,79 (s, NOH) ; $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO-d₆) δ 98,64 (s, C3), 107,32 (d, $J = 162,3$, C7), 111,36 (d, $J = 165,8$, C7'), 116,59 (s, C3a'), 120,55 (d, $J = 167,2$, C5'), 121,42 (d, $J = 159,5$, C6), 121,65 (s, C3a), 123,74 (d, $J = 163,0$, C4), 128,02 (d, $J = 167,8$, C4'), 131,84 (d, $J = 158,8$, C6'), 138,21 (s, C5), 140,87 (s, C7a), 144,53 (s, C7a'), 145,52 (s, C2'), 151,32 (s, C3'), 171,17 (s, C2) Anal. ($\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{NaO}_2\text{S}$) C, H, N.

indirubine-5-sulfonamide

On opère comme décrit ci-dessus pour l'indirubine. En partant de 120 mg d'isatine-5-sulfonamide (0,530 mmole) et de 79 mg d'indoxylacétate (0,045 mmole), on obtient 79 mg (92,0 %) de 25 5-méthyl indirubine sous forme de poudre noire contenant 8% en masse d'indigo (l'indigo a été identifié par DC et $^1\text{H-RMN}$) ; $R_f = 0,79$ (acétate d'éthyle) : $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-d₆) δ 7,04-7,08 (m, C7H et C5'H), 7,23 (s, NH₂), 7,44 (d, $J = 7,9$, C7'H), 7,60 (pt, C6'H), 7,69 (d, $J = 7,4$, C6H), 7,74 (d, $J = 8,1$, C4'H), 9,31 (s, C4H), 11,15 (s) et 11,25 (s) (N1H et N1'H) ; $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO-d₆) δ 104,92 (s, C3), 113,56 (d, $J = 159,9$, C7'), 119,01 (s, C3a'), 121,13 (s, C3a), 121,72 (d, $J = 165,2$, C5'), 122,27 (d, $J = 169,8$, C6), 124,44 (d, $J = 164,5$, C4'), 126,98 (d, $J = 159,2$, C4), 109,22 (d,

19

$J = 165,2$, C7), 137,24 (s, C5), 137,24 (d, $J = 160,5$, C6'), 139,32 (s, C7a'), 142,99 (s, C7a), 152,45 (s, C2'), 170,98 (s, C2), 188,52 (s, C3').

diméthylamide de l'acide indirubine-5-sulfonique

On opère comme décrit ci-dessus pour l'indirubine. En partant de 397 mg de diméthylamide de l'acide isatine 5-sulfonique (1,56 mmole) et de 246 mg d'indoxylacétate (1,40 mmole), on obtient 240 mg (46,5 %) de l'acide recherché sous forme de poudre violette. $R_f = 0,39$ (acétate d'éthyle/hexane 3/2 v/v): $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-d₆) δ 2,65 (s, 2 CH₃), 7,02-7,13 (m, C7H et C5'H), 7,44 (d, $J = 8,1$, C7'H), 7,57-7,72 (m, C6H, C4'H, et C6'H), 9,21 (s, C4H), 11,18 (s) et 11,33 (s) (N1H et N1'H); $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO-d₆) δ 37,20 (q, $J = 139,4$, CH₃), 104,16 (s, C3), 109,11 (d, $J = 165,8$, C7), 113,22 (d, $J = 167,2$, C7'), 118,71 (s, C3 a'), 121,36 (d, $J = 165,1$, C5'), 121,48 (s, C3a), 123,18 (d, $J = 172,0$, C6), 124,22 (d, $J = 163,7$, C4'), 127,64 (s, C5), 128,06 (d, $J = 166,5$, C49, 136,93 (d, $J = 164,4$, C6'), 139,34 (s, C7a'), 143,53 (s, C7a), 152,10 (s, C2'), 170,51 (s, C2), 188,37 (s, C3'); MS m/e 369 (M+, 83), 326 (6), 262 (84), 261 (100). Anal. (C₁₈H₁₅N₃O₄S) H, N; C: calc, 58,5%; trouvé, 57,8%.

(2-hydroxyéthyl)-amide de l'acide indirubine-5 sulfonique

On opère comme décrit pour l'indirubine. En partant de 150 mg du (2-hydroxyéthyl)-amide de l'acide isatine-5-sulfonique (0,630 mmole) et de 83 mg d'indoxylacétate (0,47 mmole), on obtient 143 mg (78,9 %) du composé recherché sous forme de poudre violette; $R_f = 0,62$ (méthanol/ acétate d'éthyle 1/20 v/v): $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-d₆) δ 2,84 (t, $J\{\text{CH}_2, \text{CH}_2\} = 6,5$, visible en ajoutant D₂O, -N-CH₂-), 3,40 (m, -CH₂-O), 4,67 (t, $J = 4,6$, OH), 7,07 (m, C7H et C5'H), 7,43 -7,46 (m, C7'H et SO₂-NH-; en ajoutant D₂O: 7,44, d, $J = 8,1$, C7'H), 7,61 (pt, C6,H), 7,69-7,71 (m, C6H et C4'), 9,27 (s, C4H), 11,18 (s) et 11,29 (s) (N1H et N1'H); $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO-d₆) δ 45,00 (t, $J = 138,0$, -NH-CH₂), 59,85 (t, $J = 141,1$, -CH₂-OH), 104,52 (s, C3), 109,44 (d, $J = 165,9$, C7), 113,60 (d, $J = 168,5$,

20

C7'), 118,92 (s, C3a'), 121,36 (s, C3a), 121,74 (d, $J = 164,0$,
 C5'), 122,95 (d, $J = 162,4$, C6), 124,52 (d, $J = 159,6$, C4'),
 127,53 (d, ${}^1J_{C,H} = 165,9$, C4), 133,20 (s, C5), 137,29 (d, $J =$
 163,4, C6'), 139,44 (s, C7a'), 143,32 (s, C7a), 152,46 (s, C2'),
 170,87 (s, C2), 188,70 (s, C3'), MS m/e 385 (M^+ , 40), 355 (48),
 325 (29), 262 (35), 261 (100). Anal. ($C_{18}H_{15}N_3O_5S$) C, H, N.

bis-(2-hydroxyéthyl)-amide de l'acide indirubine-5-sulfonique

On opère comme décrit pour l'indirubine. En partant de 400 mg de bis-(2-hydroxyéthyl) amide de l'acide isatine-5-sulfonique bis-(2-hydroxyéthyl) amide (1,27 mmole) et 167 mg d'indoxyl acétate (0,953 mmole), on obtient 355 mg (86,7 %) de l'amide mentionné ci-dessus sous forme de poudre violette, $R_f = 0,51$ (méthanol/acétate d'éthyle 1/20 v/v): 1H -RMN (DMSO-d₆) δ 3,20 (t, $J = 6,5$, 2 -N-CH₂), 3,56 (m, 2 -CH₂O-), 4,84 (t, $J = 5,5$, 2 -OH), 7,09-7,05 (m, C7H et C5'H), 7,72-7,68 (m, C6H et C4'), 7,45 (d, $J = 8,0$, C7'H), 7,61 (m, C6'), 9,26 (s, C4H), 11,18 (s) et 11,32 (s) (N1H et N1'H); ${}^{13}C$ -RMN (DMSO-d₆) δ 51,32 (t, $J = 135,0$, 2 -NH-CH₂), 60,01 (t, $J = 141,0$, 2 -CH₂-OH), 104,31 (s, C3), 109,48 (d, $J = 165,3$, C7), 113,62 (d, $J = 168,5$, C7'), 118,91 (s, C3a'), 121,69 (s, C3a), 121,79 (d, $J = 164,0$, C5'), 122,88 (d, $J = 162,4$, C6), 124,64 (d, $J = 162,7$, C4'), 127,98 (d, $J = 165,2$, C4), 131,51 (s, C5), 137,32 (d, $J = 160,1$ Hz, C6'), 139,61 (s, C7a'), 143,59 (s, C7a), 152,48 (s, C2'), 170,81 (s, C2), 188,87 (s, C3'); MS m/e 429 (M^+ , 9), 369 (22), 365 (22), 355 (63), 261 (31), 43 (100). Anal. ($C_{20}H_{19}N_3O_6S$) C, H, N.

méthylamide de l'acide indirubine-5-sulfonique

On opère comme décrit ci-dessus pour l'indirubine. En partant de 380 mg du méthylamide de l'acide isatine-5-sulfonique (1,58 mmole) et de 227 mg d'indoxylacétate (1, 30 mmole), on obtient 370 mg (80,1 %) de l'amide ci-dessus sous forme d'une poudre violette, $R_f = 0,72$ (acétate d'éthyle): 1H -RMN (DMSO-d₆) δ 2,46 (d, $J = 5,0$, CH₃), 7,05-7,09 (m, C7H et C5'H), 7,32 (q, NH-CH₃), 7,45 (d, $J = 8,3$, C7'H), 7,61 (m, C6'H), 7,67-7,71 (m, C6H et

21

C4'), 9,27 (s, C4H), 11,18 (s) et 11,30 (s) (N1H et N1'H); ^{13}C -RMN (DMSO-d₆) δ 28,65 (q, $J = 13$ 8,7, CH₃), 104,48 (s, C3), 109,41 (d, $J = 165,7$, C7), 113,58 (d, $J = 165,7$, C7'), 118,90 (s, C3a'), 121,42 (s, C3a), 121,73 (d, $J = 171,0$, C5'), 123,13 (d, $J = 164,5$, C6), 124,50 (d, $J = 159,8$, C4'), 127,61 (d, $J = 165,7$, C4), 131,93 (s, C5), 137,28 (d, $J = 160,6$, C6'), 139,43 (s, C7a'), 143,36 (s, C7a), 152,45 (s, C2'), 170,85 (s, C2), 188,68 (s, C3'); MS m/e 255 (M⁺, 15), 263 (18), 262 (100), 261 (7). Anal. (C₁₇H₁₃N₃O₄S) C, H, N.

10 5-iodoisatine

On opère comme décrit par Roedig, Mueller E. (Hrsg.), Methoden der organischen Chemie (Houbeyn-Weyl), Stuttgart, Georg Thieme Verlag 1960, 5/4, 586, et Borsche et al Chem.Ber.1924, 1770-1775, $R_f = 0,60$ (acétone/éther de pétrole 40-70 1/1 v/v); PF 262 °C: ^1H -RMN (DMSO-d₆) δ 6,75 (d, $J = 8,3$, C7H), 7,75 (s, C4H), 7,78 (d, $J = 8,2$, C6H), 11,09 (b, N1H); ^{13}C -RMN (DMSO-d₆) δ 85,39 (s, C5), 114,59 (d, $J = 167, 1$, C7), 119,89 (d, $J = 7,2$, C3a), 132,38 (d, $J = 170,3$, C4), 145,76 (d, $J = 167,1$, C6), 145,76 (d, $J = 167,1$, C6), 149,95 (b, C7a), 158,66 (s, C2), 183,06 (s, C3); MS m/e 262 (M⁺, 100), 234 (43).

diméthylamide de l'acide isatine-5-sulfonique

On opère comme décrit par Haller, brevet DE 715760, 1938, $R_f = 0,18$ (acétate d'éthyle /hexane 1 /1 v/v): ^1H -RMN (DMSO-d₆) δ 2,62 (s, 2 CH₃), 7,12 (d, $J = 8,2$, C7H), 7,71 (s, C4H), 7,94 (d, $J = 8,2$, C6H), 11,47 (s, N1H); ^{13}C -RMN (DMSO-d₆) δ 182,89 (s, C3), 159,37 (s, C2), 153,60 (s, C7a), 136,98 (d, $J = 167,32$, C6), 128,62 (s, C5), 123,27 (d, $J = 169,2$, C4), 118,05 (s, C3a), 112,68 (d, $J = 169,2$, C7), 37,48 (q, $J = 140,1$, 2 CH₃). Anal. (C₁₀H₁₀N₂O₄S) C, H, N.

bis-(2-hydroxyéthyl)-amide de l'acide isatine-5-sulfonique

On opère comme décrit par Haller ci-dessus en partant de 526 mg de bis-(2-hydroxyéthyl)-amine (5,00 mmole) et de 1,00 g de 3,3-

22

dichloro-2-oxo-2,3-dihydroindol-5-sulfonylé (voir Haller ci-dessus) (3,34 mmole). Le précipité qui se forme est huileux et boueux. On décante le surnageant, puis on mélange le précipité et le surnageant avec 5 ml d'eau. On porte à reflux 2 h. En refroidissant, on obtient un précipité de cristaux rouge. Rendement: 476 mg (45,3 %), $R_f = 0,51$ (méthanol/acétate d'éthyle 1/20 v/v): $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-d₆) δ 2,78 (t, $J = 6,2$, 2 -N-CH₂-), 3,38 (t, $J = 6,2$, 2-CH₂-O-), 7,08 (d, $J = 8,2$, C7), 7,78 (s, C4), 7,96 (d, $J = 8,2$, C6), 11,43 (s, N1H); $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO-d₆) δ 50,73 (t, $J = 138,8,2$ -N-CH₂-), 59,64 (t, $J = 141,7$, 2 -CH₂OH-), 112,57 (d, $J = 168,6$, C7), 117,91 (s, C3a), 122,78 (d, $J = 169,3$, C4), 133,29 (s, C5), 136,44 (d, $J = 166,4$, C6), 153,28 (s, C7a), 159,37 (s, C2), 182,95 (s, C3). Anal. ($\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$) C, H, N.

6-iodoisatine

On opère comme décrit par Marvel et al., *Organic Syntheses*, Coll. Vol.1, 2nd ed.; Gilman, H Ed.; Wiley & Sons: New York, 1941, 327-330, en utilisant 1,50 g de 2-hydroxyimino-N-(3-iodophényl)-acétamide (5,17 mmole) et 3,9 ml d'acide sulfurique concentré. Après filtration, le produit brut, formé d'un mélange de 4- et 6-iodoisatine et de sous-produits, est purifié selon Sadler, J.Org.Chem. 1956, 21, 169-170 et Holt et al, Proc.R.Soc. London B 1958, 148, 481-494. On obtient 216 mg (15,0 %) de cristaux orange; PF 255-258 °C; $R_f = 0,76$ (acétate d'éthyle/hexane 1/1 v/v): $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-d₆) δ 7,25 (m, C4H et C7H), 7,45 (d, $J = 7,6$, C5H), 11,07 (s, N1H); $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO-d₆) δ 107,28 (d, $J = 10,4$, C6), 117,41 (s, C3a), 120,83 (d, $J = 170,3$, C7), 125,84 (d, $J = 173,7$, C4), 131,82 (d, $J = 167,9$, C5), 151,30 (s, C7a), 159,35 (s, C2), 183,79 (s, C3). Anal. ($\text{C}_8\text{H}_4\text{INO}_2$) C, H, N.

isoindigo

On opère comme décrit par Wahl et al, Compte rendus hebdomadaires des séances de l'académie des sciences, 1909, 716-19 et 4(5), 1039-43: $R_f = 0,67$ (acétate d'éthyle/hexane 1/1 v/v): $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-d₆) δ 6,85 (d, $J = 7,7$, C7H et C7'H), 6,97 (pt, C5'H et

23

CS'H), 7,34 (pt, C6H et C6'H), 9,07 (d, $J = 8,0$, C4H et C4'H), 10,90 (s, N1H et N1'H); ^{13}C -RMN (DMSO-d₆) 109,42 (d, $J = 162,5$, C7 et C7'), 121,04 (d, $J = 161,2$, C5 et C5'), 121,58 (s, C3a et C3a'), 129,21 (d, $J = 166,5$, C6 et C6'), 132,52 (d, $J = 159,9$, C4 et C4'), 133,24 (s, C3 et C3'), 143,98 (s, C7a et C7a'), 168,88 (s, C2 et C2'); MS m/e 262 (M⁺, 100), 234 (85), 205 (18). Anal. (C₁₆H₁₂N₂O₂) C, H, N.

2,2'-bisindole

On opère comme décrit par Bergman et al, Tetrahedron 1995, 51 (19), 563-42, $R_f = 0,82$ (UV, acétate d'éthyle /hexane 1/1): GC/MS $R_t = 14,1$ min, m/e 232 (M⁺, 100); λ_{max} . (éthanol) 221 (4,78), 271 (4,00), 333 (4,80), 351 (4,79). Anal. (C₁₆H₁₂N₂) C, H, N.

3,3'-diphényl-2,2'-bisindole

On opère comme décrit par Fürstner et al, Angewandte Chemie, 1995, 107 (6), 725-8. La recristallisation à partir d'acétate d'éthyle / éther de pétrole (40-70) 115 v/v conduit à des cristaux incolores (55.8 %), $R_f = 0,50$ (UV, acétate d'éthyle / éther de pétrole (40-70) 115 v/v): GC/MS $R_t = 19,0$ min, m/e 384 (M⁺, 100).

isatin-5-sulfonamide

On refroidit au préalable une solution aqueuse à 25 % d'ammoniaque (5,0 ml) à 0-5°C avant d'ajouter un échantillon de 0,50 g de chlorure de 3,3-dichloro-2-oxo-2,3-dihydroindol-5-sulfonyle (voir Haller ci-dessus), (1,7 mmole), par portions, en agitant et en refroidissant à nouveau. Après 2h, on ajoute une petite quantité de glace pilée et 20 % d'acide chlorhydrique jusqu'à réaction acide du mélange. Le solvant est éliminé sous vide et le résidu orange est séché sur KOH. La poudre jaune obtenue est extraite 3 fois avec 35 ml d'acétone. L'acétone est éliminée sous vide, ce qui conduit à 140 mg (36,4 %) de poudre orange, $R_f = 0,73$ (acétate d'éthyle): ^1H -RMN (DMSO-d₆) δ 7,05 (d, $J = 8,2$, C7), 7,41 (s, NH₂), 7,85 (s, C4), 7,98 (d, $J = 8,2$, C6), 11,39 (s, N1H); ^{13}C -RMN (DMSO-d₆) δ 112,12 (d, $J = 168,3$, C7),

24

117,73 (s, C3a), 121,67 (d, $J = 166,8$, C4), 134,97 (d, $J = 165,4$, C6), 138,36 (s, C5), 152,56 (s, C7a), 159,50 (s, C2), 184,22 (s, C3); MS m/e 226 (M^+ , 28), 198 (100).

(2-hydroxyéthyl)-amide de l'acide isatine-5-sulfonique

5 On opère selon Haller ci-dessus, en partant de 295 mg de 2-aminoéthanol (4,83 mmole, 0,300 ml), 5,1 ml d'éthanol et 0,900 mg de chlorure 3,3-dichloro-2-oxo-2,3-dihydroindol-5-sulfonyl (Haller) (3,01 mmole). Après 30 min d'agitation, on ajoute à nouveau 0,100 ml de 2-aminoéthanol, et 15 min plus tard 20 g de glace pilée et 0,900 ml d'acide chlorhydrique à 20 %. En réchauffant à la température ambiante, on obtient une masse huileuse qui se dépose au fond du récipient. On laisse décanter le surnageant et le solvant restant est éliminé sous vide. L'huile jaune obtenue est portée à reflux dans l'eau pendant 15 2 h. En refroidissant, la solution orange obtenue précipite 374 mg (45,8 %) de cristaux jaune, $R_f = 0,52$ (méthanol /acétate d'éthyle 1/20 v/v): $^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6) δ 2,73- 2,82 (m, N-CH₂-), 3,38 (t, $J = 6,1$ Hz, -CH₂-O-), 7,07 (d, $J = 7,6$, C7), 7,66 (t, $J = 5,7$ Hz, -SO₂-NH-), 7,81 (s, C4), 7,96 (d, $J = 8,4$, C6), 11,42 (s, N1 H).

méthylamide de l'acide isatine-5-sulfonique

On opère selon Haller ci-dessus, en partant de 0,572 ml d'une solution aqueuse à 40 % de méthylamine (6,62 mmole), 5,6 ml d'éthanol et 1,00 g de chlorure de 3,3-dichloro-2-oxo-2,3-dihydroindol-5-sulfonyle (Haller) (3,34 mmole). Le précipité qui se forme est éliminé par filtration et on porte à reflux dans l'eau pendant 2 h. Par refroidissement, la solution précipite (cristaux jaune). Rendement: 420 mg (52,3 %), $R_f = 0,29$ (acétate d'éthyle /hexane 2/1 v/v): $^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6) δ 2,41 (d, $J = 5,0$, CH₃), 7,08 (d, $J = 8,3$, C7), 7,48 (q, $J = 5,0$, NH₂), 7,77 (s, C4), 7,95 (d, $J = 8,3$, C6), 11,42 (s, N1H); $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6) δ 28,52 (q, $J = 139,2$, CH₃), 112,40 (d, $J = 168,9$, C7), 118,04 (s, C3a),

25

122,48 (d, $J = 169,2$, C4), 133,13 (s, C5), 136,15 (d, $J = 166,0$, C6), 153,44 (s, C7a), 159,44 (s, C2), 183,04 (s, C3).

2-hydroxyimino-N-(3-iodophényl)-acétamide

On opère comme décrit par Marvel et Hiers ci-dessus et on purifie le produit obtenu en procédant selon Holt and Sadler ci-dessus; PF 152-154 °C; $R_f = 0,29$ (acétate d'éthyle /hexane 1/1 v/v) : ^1H -RMN (DMSO-d₆) δ 7,12 (pt, $J = 8,1$, C5'H), 7,44 (pt, $J = 7,9$, C4'H ou C6'H), 7,63 (s, C2H), 7,65 (pt, $J = 8,2$, C4'H ou C6'H), 8,16 (Pt, $J = 1,7$, C2'H), 10,27 (s, NH), 12,27 (s, C2NOH); ^{13}C -RMN (DMSO-d₆) δ 94,69 (d, $J = 11,7$, C3'), 119,32 (d, $J = 165,7$, C6'), 128,22 (d, $J = 168,0$, C2'), 130,95 (d, $J = 162,8$, C5), 132,57 (d, $J = 168,1$, C4'), 140,06 (s, C1'), 144,05 (d, $J = 171,5$, C2), 160,67 (s, C1).

• Tampons

15 Les tampons utilisés ont les compositions suivantes:

Tampon d'homogénéisation: - 60 mM de β -glycérophosphate, 15 mM de p-nitrophénylphosphate, 25 mM de Mops (pH 7,2), 15 mM d'EGTA, 15 mM de MgCl₂, 1 mM de DTT, 1 mM vanadate de sodium, 1 mM de NaF, 1 mM de phénylphosphate, 10 μg de leupeptine/ml, 10 μg d'aprotinine/ml, 10 μg d'inhibiteur de trypsine de soja/ml et 100 μM de benzamidine.

Tampon A : 10 mM de MgCl₂, 1 mM de EGTA, 1 mM de DTT, 25 mM de Tris-HCl pH 7,5, 50 μg d'héparine/ml.

Tampon C : tampon d'homogénéisation, mais renfermant 5 mM d'EGTA, et dépourvu de NaF et d'inhibiteurs de protéase.

Tris-tampon salin de Tween-20 (TBST) : 50 mM de Tris pH 7,4, 150 mM de NaCl, 0,1% de Tween-20^R.

Tampon de lyse hypotonique (HLB) : 50 mM de Tris-HCl ph 7,4, 120 mM de NaCl, 10% de glycérol, 1% de Nonidet-P40, 5 mM de DTT, 1 mM d'EGTA, 20 mM de NaF, 1 mM d'orthovanadate, 5 μM de microcystine, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de chacun des produits suivants : leupeptine, aprotinine, pepstatine.

. Préparations de kinases et déterminations des activités

Les activités des kinases ont été déterminées dans le tampon A ou C (à moins d'indications contraires), à 30°C, à une concentration finale en ATP de 15 µM. Les valeurs des essais à blanc ont été soustraites et les activités calculées en pmoles de phosphate incorporé pour une incubation de 10 min. Les valeurs des activités sont généralement exprimées en % de l'activité maximale, c'est-à-dire, en l'absence d'inhibiteurs.

Des essais témoins ont été réalisés à l'aide de dilutions appropriées de Me₂SO. Dans quelques cas, comme indiqué ci-après, la phosphorylation des substrats est déterminée par autoradiographie après SDS-PAGE.

La GSK-3β utilisée est soit l'enzyme purifiée à partir du muscle de lapin ou exprimée et purifiée à partir de cellules d'insecte Sf9 (Hughes et al, 1992, Eur. J. Biochem., 203 : 305,311). Les déterminations ont été effectuées avec une dilution à 1/100 dans 1 mg de BSA/ml de DTT 10 mM, avec 5 µl de GS-1 40 µM comme substrat, dans le tampon A, en présence de 15 µM [³²P] ATP (3000 Ci/moles ; 1 mCi/ml) dans un volume final de 30 µl. Après 30 minutes d'incubation à 30°C, des aliquotes de 25 µl de surnageant ont été appliqués sur des bandes de papier de phosphocellulose Whatman P81, de 2,5 x 3 cm, et 20 secondes plus tard, les filtres ont été lavés 5 fois (pendant au moins 5 min. à chaque fois), dans une solution de 10 ml d'acide phosphorique/l d'eau. Les filtres humides ont fait l'objet de comptage en présence de 1 ml de fluide de scintillation ACS (Amersham).

La CDK1/cycline B utilisée a été extraite à l'aide d'un tampon d'homogénéisation à partir d'ovocytes d'étoiles de mer (*Marthasterias glacialis*) et purifiée par chromatographie d'affinité sur des billes de p9^{CKShs1}- Sépharose à partir desquelles le produit a été élué par du p9^{CKShs1} libre, comme

27

décrit par Meijer et al., 1997, (*Methods in Enzymology*, vol 283 : 113-128), et Borgne et al., 1999, *J. Biol. Chem.* 274 : 11977-11986.

L'activité kinase a été déterminée dans le tampon C, avec 1 mg d'histone H1/ml, en présence de 15 μ M de [γ^{32} P] ATP ((3000 Ci/mmol ; 1 mCi/ml) dans un volume final de 30 μ l.

Après 10 minutes d'incubation à 30°C, des aliquotes de 25 μ l de surnageant ont été déposés sur des papiers de phosphocellulose P81 et traités comme décrit ci-dessus.

La CDK5/p25 a été reconstituée en mélangeant des quantités égales de CDK5 et de p25 de mammifère recombinantes, exprimées dans *E.coli* sous forme de protéine de fusion GST (Glutathione-S-transférase) et purifiées par chromatographie d'affinité sur glutathione-agarose p25 est une version tronquée de p35, l'activateur de CDK5 de 35kDa. Son activité a été déterminée dans le tampon C comme décrit pour CDK1/cycline B.

• Phosphorylation in vitro et in vivo de tau :

Cellules et virus : on a cultivé les cellules SF9 (InVitrogen, San Diego, CA) à 27°C dans un milieu de Grace de culture en monocouche (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), supplémenté avec 10% de sérum bovin foetal et 50 μ g de gentamycine/ml et 2,5 μ g d'amphotéricine/ml. BaculoGold a été obtenu auprès de PharMingen (San Diego, CA), et pVL1392 de InVitrogen.

La transfection de tau : on a excisé, à partir d'un vecteur d'expression bactérien pNG2 (Biernat et al., 1993, *Neuron* 11 : 153-163) et le gène codant pour htau23, l'isoforme tau humain le plus court, avec XbaI et BamHI. Le gène a été inséré dans le vecteur de transfert de baculovirus pVL1392 découpé avec les mêmes endonucléases. Le système BaculoGold a été utilisé pour la construction du vecteur contenant le baculovirus tau. L'ADN de BaculoGold est un type modifié de baculovirus contenant une délétion léthale.

28

La co-transfection de l'ADN de BaculoGold avec un vecteur de transfert de baculovirus complément permet de récupérer la délétion léthale de cet ADN viral et de reconstituer des particules de virus viables portant la séquence codant pour htau23.

L'ADN plasmidique utilisé pour les transfections a été purifié en utilisant des cartouches de QIAGEN (Hilden, Allemagne).

Les cellules Sf9 cultivées en monocouches (2×10^6 cellules dans un récipient de culture cellulaire de 60 mm) ont été co-transfectées avec de l'ADN de baculovirus (0,5 µg d'ADN de BaculoGold) et avec les dérivés de pVL1392 (2 µg) en utilisant la méthode de co-précipitation au phosphate de calcium. La présence de protéine recombinante a été examinée dans les cellules infectées 5 jours après l'infection par SDS-PAGE et Western blot.

Phosphorylation de tau dans les cellules Sf9.

Pour déterminer les effets des inhibiteurs de kinase sur la phosphorylation de tau, les cellules Sf9 infectées par le baculovirus exprimant htau23 ont été traitées 36 heures après l'infection, avec 50 µM d'indirubine-3'-monoxime pendant 5 heures avant d'être recueillies. Pour obtenir des échantillons de tau témoins avec une phosphorylation plus élevée, les cellules Sf9 exprimant htau23 ont été traitées avec 0,2 µM d'acide okadaïque pendant 5 heures avant récolte.

Western blot de tau :

Les cellules Sf9 ont été infectées avec un virus recombinant à une MOI de 1 à 5.

Les lysats cellulaires ont été préparés dans le tampon de lyse hypotonique (HLB).

Après 15 minutes de centrifugation à 16000 g, le surnageant a été récupéré et sa concentration en NaCl augmentée jusqu'à 500 mM. Le surnageant a ensuite été soumis à ébullition

29

pendant 10 min. et recentrifugé à 16000 g pendant 15 min. Les protéines (3 µg) ont été résolues par SDS-PAGE, transférées sur une membrane de PVDF et étudiées avec un Western blot avec les anticorps suivants : AT-8 (1: 2000), AT-180 (1:1000), AT-100 (1:500), PHF-1 (1:600) et l'anticorps polyclonal anti-tau K9JA.

La phosphorylation de tau *in vitro* a été effectuée en utilisant de la GSK-3β purifiée et la protéine tau-32 humaine recombinante en tant que substrat. Après 30 minutes d'incubation en présence de différentes concentrations d'indirubine-3'-monoxime, dans les conditions d'étude de la GSK-3β décrite ci-dessus, la réaction de la kinase a été arrêtée par addition de tampon Laemmli. La protéine tau a été résolue en SDS-PAGE à 10% et son taux de phosphorylation visualisé par autoradiographie.

Exemple 1 : Etude de l'inhibition de GSK-3β, de CDK5/p25 et de CDK1/cycline B par les indirubines.

Les activités kinases ont été déterminées avec un substrat approprié (GSK-3β: GS1 peptide; CDKs: histone H1) en présence de 15 µM d'ATP et à des concentrations croissantes en dérivés testés.

Les valeurs de IC₅₀ ont été calculées à partir des courbes dose/réponse et sont données dans le tableau 1.

Tableau 1

Composés	GSK3	CDK1	CDK5
5-iodo-indirubine-3'-monoxime	0,009	0,025	0,020
indirubine-3'-monoxime	0,022	0,180	0,100
5-SO ₂ hydroxyéthylamide indirubine	0,033	0,065	0,050
5-SO ₃ NH ₂ -indirubine	0,040	0,110	0,075
5-nitro-indirubine	0,042	0,250	0,380
5-chloro-indirubine	0,050	0,280	0,230
5-bromo-indirubine	0,055	0,230	0,250
5-méthyl-indirubine	0,062	0,280	0,210
5-iodo-indirubine	0,068	0,220	0,200
5-fluoro-indirubine	0,078	0,350	0,750
5-SO ₃ Na-indirubine 3'-monoxime	0,080	0,005	0,007
5-SO ₂ -méthylamide-indirubine	0,110	0,080	0,020
6-iodo-indirubine	0,130	0,800	1,500
5-SO ₂ diméthylamide-indirubine	0,180	0,100	0,060
5-5'-dibromo-indirubine	0,250	600	200
5-SO ₃ H-indirubine	0,280	0,051	0,065
5'-bromo-indirubine	0,350	0,510	4
5-SO ₂ dihydroxyéthylamide-indirubine	0,400	0,150	0,150
indirubine	0,600	10,000	5,500
acide 5'-bromo-indirubine-sulfonique	4,000	0,080	0,075

Les déterminations effectuées à titre comparatif avec

d'autres indigoides, comme les dérivés d'isatine ou d'indigo,

donnent les résultats rapportés dans le tableau 2.

31
Tableau 2

Composés	GSK3	CDK1	CDK5
isatine-5-sulfonique acide-dihydroxyéthylamide	29	600	800
3-indoxylacétate	70	>1000	>1000
6-iodo-isatine	75	600	800
acide isatine-5-sulfonique-diméthylamide	85	>1000	>1000
3,3'-diphényl-2,2'-bisindol	180	500	500
1-phényl-indirubine	200	500	800
acide indigo-5,5',7,-trisulfonique (sel K3)	280	>1000	>1000
5-nitro-isatine	310	>1000	>1000
iso-indigo	320	40	130
acide indigo-5,5',7,7'-tétrasulfonique (sel K4)	350	>1000	>1000
indigo carmine	360	400	>1000
2-(2indolyl)indole	380	700	300
5-bromo-3-indoxylacétate	400	>1000	>1000
indigo	550	>1000	>1000
5-iodo-isatine	>1000	300	800
5-bromo-isatine	>1000	600	>1000
1-méthyl-indirubine	>1000	>1000	>1000
isatine	>1000	>1000	>1000
5-fluoro-isatine	>1000	>1000	>1000
5-chloro-isatine	>1000	>1000	>1000
5-méthyl-isatine	>1000	>1000	>1000
acide 5-sulfonique isatine, sel de sodium	>1000	>1000	>1000
1-méthyl-isatine	>1000	>1000	>1000
1-phényl-isatine	>1000	>1000	>1000

L'examen de ces 2 tableaux montre que, parmi les indigoïdes, seuls les dérivés d'indirubine exercent à la fois un effet inhibiteur vis-à-vis de GSK-3 β et de CDKs. Il ressort en

32

effet clairement de ces résultats que ni l'isatine, ni l'indigo ou leurs dérivés, n'exercent d'effet significatif sur l'une de ces 3 kinases.

Les figures 1A à 1D donnent les courbes dose-réponse pour la 5-iodo-indirubine-3'-monoxime (A), la 5,5'-dibromoindirubine (B), l'acide 5-sulfonique indirubine-3'-monoxime (C) et l'indirubine-3'-monoxime (D). L'inhibition de GSK-3 β et des CDKs est déterminée comme indiqué plus haut.

L'activité est exprimée en % de l'activité maximale (sans inhibiteurs).

Exemple 2 : Etude du mécanisme d'action des indirubines

On procède à cet effet à des expériences de cinétique en faisant varier à la fois les niveaux d'ATP et les concentrations en indirubine-3'-monoxime.

Les résultats obtenus sont donnés sur la figure 2 ($1/V$ en fonction de $1/ATP$).

Les concentrations en ATP dans le mélange réactionnel varient de 0 à 2 μ M, la concentration de GS-1 étant maintenue constante à 6,7 μ M.

On constate que l'indirubine-3'-monoxime agit en compétition avec l'ATP pour se fixer.

La linéarité de la pente dans l'encadré de la figure montre qu'il s'agit d'un inhibiteur linéaire.

La constante apparente d'inhibition K_i est de 50 nM.

Exemple 3 : Etude de l'inhibition par les indirubines, *in vitro* et *in vivo*, de la phosphorylation de tau par GSK-3 β

On rapporte les résultats obtenus avec l'indirubine-3'-monoxime sur la phosphorylation d'un substrat physiologique, constitué par la protéine tau liant des microtubules.

On utilise une protéine tau humaine recombinante exprimée dans une bactérie. La protéine est phosphorylée *in vitro* par GSK-3 β en présence des concentrations croissantes en

indirubine-3' -monoxime. On procède ensuite à une résolution par SDS-PAGE, suivie d'une autoradiographie.

La figure 3A donne les résultats obtenus et montre que la phosphorylation est inhibée de manière dose-dépendante par l'indirubine-3' -monoxime, avec une IC₅₀ autour de 100 nM. Une quantification de ces résultats est donnée sur la figure 3B qui donne le % de phosphorylation de tau en fonction de la concentration en indirubine-3'-monoxime (nM).

Des études *in vivo* ont été également effectuées. Les résultats sont illustrés par la figure 3C.

Les cellules Sf9 exprimant htau23 ou bien n'ont pas subi de traitement (-) ou ont été exposées à 0,2 µM d'acide okadaïque (OA), ou à 50 µM d'indirubine-3' -monoxime ou à NG-97 pendant 5h.

Les lysats cellulaires (3 µg de htau23) ont été résolus par SDS-PAGE, colorés au bleu de Coomassie ou mis à réagir avec divers anticorps. K9JA (anticorps pan-tau) reconnaît toutes les préparations renfermant tau. AT8, AT 180 et PHF1 sont spécifiques pour différents motifs phosphorylés SP ou TP à savoir, respectivement, Ser 202 ; Thr 205, Thr 231; Ser 235 et Ser 396 ; Ser 404 (numérotation dans htau 40, qui correspond à l'isoforme le plus long de la protéine tau humaine). AT 100 reconnaît la protéine tau phosphorylée à T 212 et S214 (réaction très spécifique de la protéine tau chez la maladie d'Alzheimer, mais qui se produit également dans les cellules Sf9, si les 2 sites sont phosphorylés).

La disparition du signal AT100 après traitement avec l'indirubine-3' - monoxime montre que ce dérivé est bien capable d'inhiber une activité de type GSK-3β dans les cellules Sf9.

La figure 3D représente le diagramme des isoformes tau, des épitopes reconnus par les anticorps et des sites préférés de phosphorylation : (a) htau 23, (b) htau 40, le plus petit et le plus grand des 6 isoformes générés par l'assemblage alternatif.

34

(résidus 352 et 441). La protéine htau 23 est dépourvue des inserts N-terminaux et de la deuxième répétition. Les répétitions sont représentées en grisé et les régions adjacentes ensombré . Certains épitopes sont indiqués.

5 Exemple 4 : Etude de l'inhibition par les indirubines, *in vitro* et *in vivo*, de la phosphorylation de DARPP-32 par CDK5/p25

La protéine neuronale DARPP-32 a été identifiée comme substrat physiologique de CDK5/p25. DARPP-32 devient un inhibiteur de kinase cAMP-dépendante (PKA) lorsqu'il est 10 phosphorylé par CDK5/p25 sur Thr 75.

Cette protéine a été utilisée comme substrat pour la phosphorylation *in vitro* par CDK5/p25.

On prépare des coupes de striatum de cerveau de souris adulte en opérant selon la méthodologie standard. Après mise en 15 équilibre dans un tampon de bicarbonate de Krebs oxygéné par aération continue (95% O₂/5% CO₂), les coupes sont traitées avec différentes concentrations d'indirubine-3'-monoxime, ou avec 10µm de roscovitine pendant 60 min., ou sont laissées dans le tampon de bicarbonate de Krebs pendant le même temps.

20 Les coupes sont homogénéisées par sonication dans SDS 1% et NaF 50 mM à ébullition. Les concentrations en protéines sont déterminées par la méthode BCA en utilisant une courbe standard de BSA. On soumet des quantités égales de protéine (80µg) à un SDS-PAGE en utilisant un gel d'acrylamide à 15%, on 25 effectue ensuite un transfert par électrophorèse sur une membrane de cellulose, puis des immunoempreintes avec un anticorps spécifique d'une situation de phosphorylation capable de détecter spécifiquement DARPP-32 phosphorylé sur Thr 75.

Les résultats sont rapportés sur la figure 4.

30 On constate que l'indirubine-3'-monoxime inhibe cette phosphorylation de manière concentration-dépendante, avec une IC₅₀ autour de 100 nM.

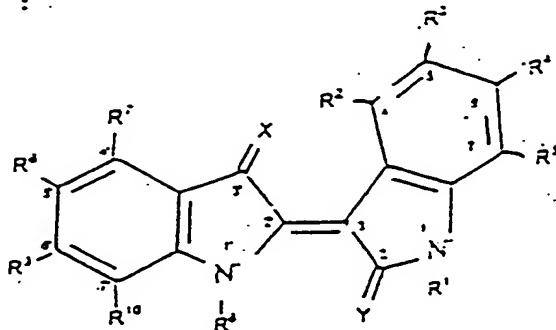
35

La phosphorylation de DARPP-32 par CDK5/p25 peut être contrôlée avec un anticorps phosphospécifique dirigé contre DARPP-32 phospho-Thr 75.

On n'observe pas de phosphorylation *in vivo* sur ce site dans le tissu p35^{-/-}. On constate une inhibition par l'indirubine-3'-monoxime, ce qui montre que les indirubines sont capables d'inhiber CDK5 *in vivo*.

36
REVENDICATIONS

1. Utilisation pour la fabrication de médicaments inhibiteurs de la GSK-3 β de dérivés d'indirubine répondant à la 5 formule générale I :



10

dans laquelle R^1 et R^6 , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, un atome d'halogène; un 15 groupe hydroxy; un groupe méthylènehydroxy; un radical alcoyle ou alkylloxy ou méthylènealkoxy, à chaîne droite ou ramifiée, en C1 à C18; un radical cycloalkyle ayant 3 à 7 atomes de carbone, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un radical aryle, aralkyle ou aryloxy, substitué ou non substitué, 20 comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe mono-, di- ou trialkylsilyle ayant 1 à 6 atomes de carbone, indépendamment l'un de l'autre, dans chaque cas, dans le groupe alkyle à chaîne droite ou ramifiée; un groupe mono-, di- ou triaryl silyle, avec des groupes aryle substitués ou non, 25 indépendamment l'un de l'autre, dans chaque cas; un groupe trifluorométhyle; un groupe -COM; -COOM; ou -CH₂COOM, avec M représentant un atome d'hydrogène, un groupe alkyle en C1 à C18, à chaîne droite ou ramifiée, substituée le cas échéant par un ou plusiers groupes hydroxy et/ou amino, ou un groupe aryle 30 comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes, pouvant être substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène, radicaux alkyle ou groupe alcoxy; un groupe -NR¹¹R¹², dans lequel R¹¹ et R¹², identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène,

un radical alkyle à chaîne droite ou ramifiée, en C1 à C18, le cas échéant substitué en outre par un ou plusieurs groupes hydroxy et/ou amino, un groupe aryle, substitué ou non, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe acyle; un groupe méthylèneamino -CH₂-NR¹¹R¹², dans lequel R¹¹ et R¹² présentent les significations ci-dessus; un groupe benzyle, dans lequel le noyau benzène comprend, le cas échéant, un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe méthylènecycloalkyle avec 3 à 7 atomes de carbone, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un résidu d'acide aminé physiologique lié à l'azote, comme un amide; un O-glycoside ou un N-glycoside, dans lequel le glycoside est choisi parmi les monosaccharides ou les disaccharides; ou un groupe méthylènesulfonate; R², R³, R⁴, R⁵, R⁷, R⁸, R⁹ et R¹⁰, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène; d'halogène; un groupe hydroxy; un groupe nitroso; un groupe nitro; un groupe alkoxy; un groupe alkyle à chaîne droite ou ramifiée, en C1 à C18, le cas échéant substitué par un ou plusieurs groupes hydroxy et/ou amino; un groupe aryle, substitué ou non, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes ; un groupe aralkyle, substitué ou non, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe aryloxy, substitué ou non comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe méthylènearyloxy, substitué ou non, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe cycloalkyle, avec 3 à 7 atomes de carbone, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe méthylènecycloalkyle, avec 3 à 7 atomes de carbone, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe trifluorométhyle; un groupe -COM; -COOM; ou CH₂COOM, avec M représentant un atome d'hydrogène, un groupe alkyle en C1 à C18, à chaîne droite ou ramifiée, substituée le cas échéant en outre par un ou plusieurs groupes hydroxy et/ou amino, ou un groupe aryle comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes,

pouvant être substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène, groupes alkyle ou groupes alcoxy ; un groupe $-NR^{11}R^{12}$, dans lequel R¹¹ et R¹², identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, un radical alkyle à chaîne droite ou ramifiée, en 5 Cl à C18, le cas échéant substitué en outre par un ou plusieurs groupes hydroxy et/ou amino, un groupe aryle substitué ou non, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes, un groupe acyle, ou dans lequel l'atome d'azote fait partie d'un groupe cycloalkyle ayant 3 à 7 atomes de carbone, comprenant le 10 cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe $-CONR^{11}R^{12}$, dans lequel R¹¹ et R¹² présentent les significations ci-dessus; un groupe hydroxylamino; un groupe phosphate; un groupe phosphonate; un groupe sulfate; un groupe sulfonate; un groupe sulfonamide; un groupe $-SO_2NR^{11}R^{12}$, dans lequel R¹¹ et R¹² 15 présentent les significations données ci-dessus; un groupe azo - N=N-R¹³, dans lequel R¹³ représente un groupe aromatique, le cas échéant substitué par un ou plusieurs groupes carboxyle, phosphoryle ou sulfonate, ou un groupe O-glycoside ou N-glycoside, dans lequel le glycoside est choisi parmi les 20 monosaccharides ou les dissacharides; ou R¹ et R⁵, et R⁶ et R¹⁰, respectivement, forment ensemble, indépendamment l'un de l'autre, un cycle ayant 1 à 4 groupes CH₂, le cas échéant substitué; et X et Y, identiques ou différents, représentent un 25 atome d'oxygène; de soufre; de sélénium; de tellurium; un groupe -NR¹⁴, dans lequel R¹⁴ représente un atome d'hydrogène; un groupe alkyle, à chaîne droite ou ramifiée, en Cl à C18, le cas échéant substitué par un ou plusieurs groupes carboxyle, phosphoryle ou sulfonate, un groupe aryle substitué ou non, comprenant le cas 30 échéant un ou plusieurs hétéroatomes, un groupe aralkyle, ou un groupe sulfonate; ou -NOR¹⁴, dans lequel le groupe R¹⁴ présente les significations données ci-dessus,

et les sels de ces dérivés physiologiquement acceptables.

39

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que, dans lesdits dérivés d'indirubine, un ou plusieurs atomes d'un ou plusieurs cycles benzéniques sont remplacés par des atomes d'azote.

5

3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que dans lesdits dérivés d'indirubine, un ou plusieurs systèmes cycliques aromatiques ou non aromatiques, qui comprennent, le cas échéant, un ou plusieurs hétéroatomes indépendamment l'un de l'autre, sont condensés au système indirubine.

4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que les dérivés d'indirubine sont liés à un ester de polyéthylèneglycol ou à un éther de polyéthylèneglycol par des liaisons, respectivement, ester ou éther.

5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que, dans lesdits dérivés d'indirubine, X et Y, identiques ou différents, représentent un groupe = O ou = NOH.

6. Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que les substituants R¹, R³, R⁴ et R⁸ desdits dérivés d'indirubine présentent les significations suivantes :

- R³: un atome d'hydrogène, d'halogène, un radical alkyle, un groupe -SO₃H, -SO₂NH₂, -SO₂-N-(CH₃)₂, -SO₂-N-C₂H₅-OH, -SO₂-N-(C₂H₅-OH)₂, -SO₂-NH-CH₃,
- R⁴ et R⁸, indépendamment l'un de l'autre: un atome d'hydrogène ou d'halogène,

40

- R¹: un radical alkyle ou aryle, les autres substituants donnés sur la formule (I) représentant un atome d'hydrogène.

5 7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que dans lesdits dérivés d'indirubine, X = Y, ces deux substituants représentant un groupe = O.

10 8. Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que les substituants R¹, R³, R⁴ et R⁸, dans lesdits dérivés d'indirubine, répondent aux significations suivantes :

- R¹: alkyle, notamment méthyle, et phényle

- R³: hydrogène, halogène (F, Cl, Br, I), NO₂,

15 - SO₃H, -SO₂NH₂, -SO₂-N(CH₃)₂, -SO₂-N-C₂H₅-OH, -SO₂-N-(C₂H₅-OH)₂, - SO₂-NHCH₃,

-R⁴ et R⁸ : halogène, en particulier I ou Br,
les autres substituants donnés dans la formule (I) représentant un atome d'hydrogène.

20 9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que lesdits dérivés sont choisis parmi l'indirubine, la 5-iodo-indirubine, la 5-bromo-indirubine, la 5-chloro-indirubine, la 5-fluoro-indirubine, la 5-méthyl-indirubine, la 5-nitro-indirubine, la 5-SO₃H-indirubine, la 5'-bromo-indirubine, la 5-5'-dibromo-indirubine ou l'acide 5'-bromo-indirubine 5-sulfonique.

30 10. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que, dans lesdits dérivés d'indirubine, X représente un groupe = NOH et Y un groupe = O.

41

11. Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que R³ représente un atome d'halogène, notamment I, ou un groupe -SO₃Na.

5 12. Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que lesdits dérivés sont choisis parmi l'indirubine-3'-monoxime, la 5-iodo-indirubine-3'-monoxime et la 5-SO₃Na-indirubine-3'-monoxime.

10 13. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que les médicaments sont préparés pour une administration par voie orale, sous forme de gélules, comprimés, dragées ou capsules.

15 14. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que les médicaments sont préparés pour une administration par voie injectable, sous forme de solution.

20 15. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, pour le traitement de pathologies impliquant GSK-3β et CDK5.

1/7

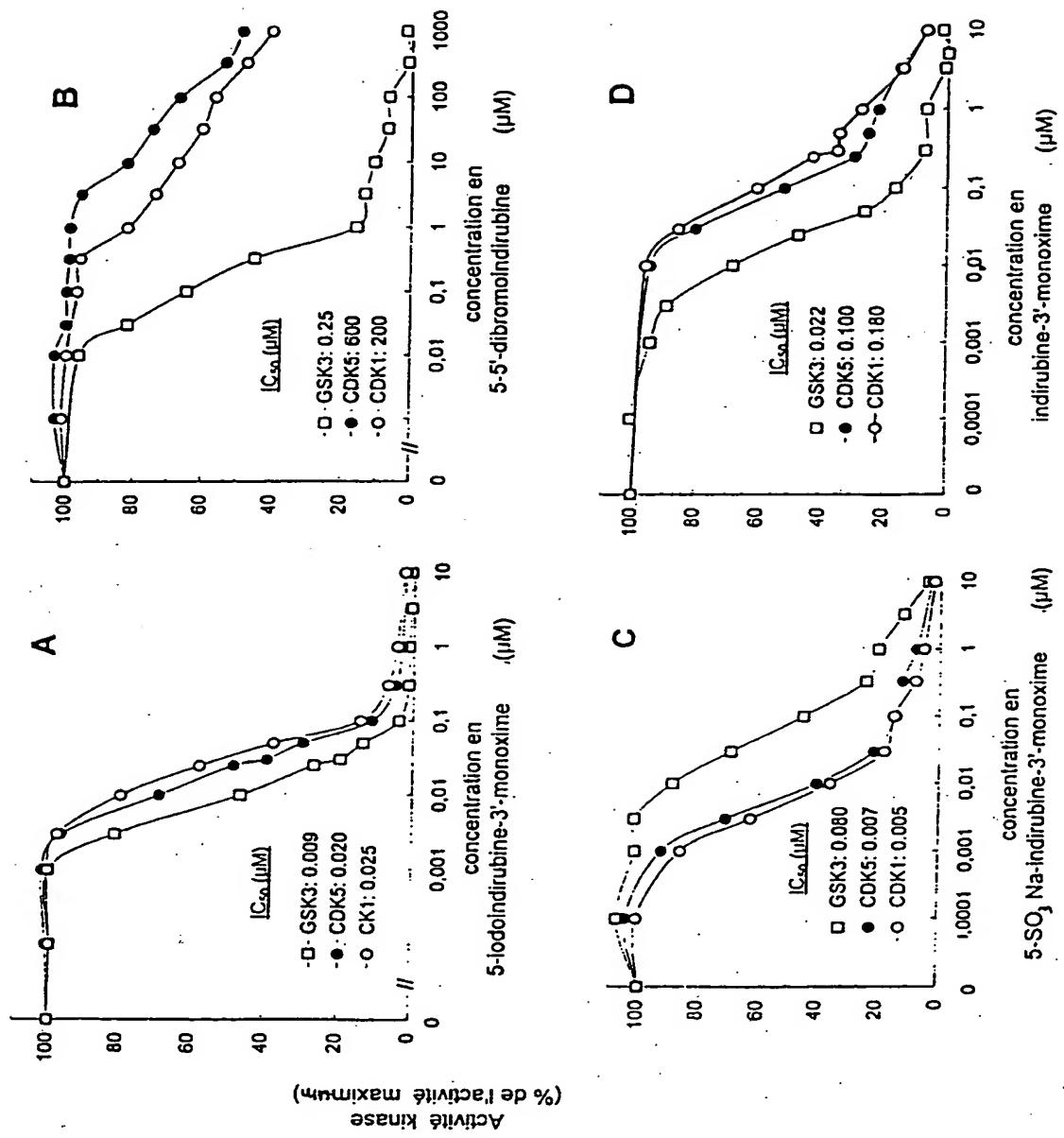


FIGURE 1

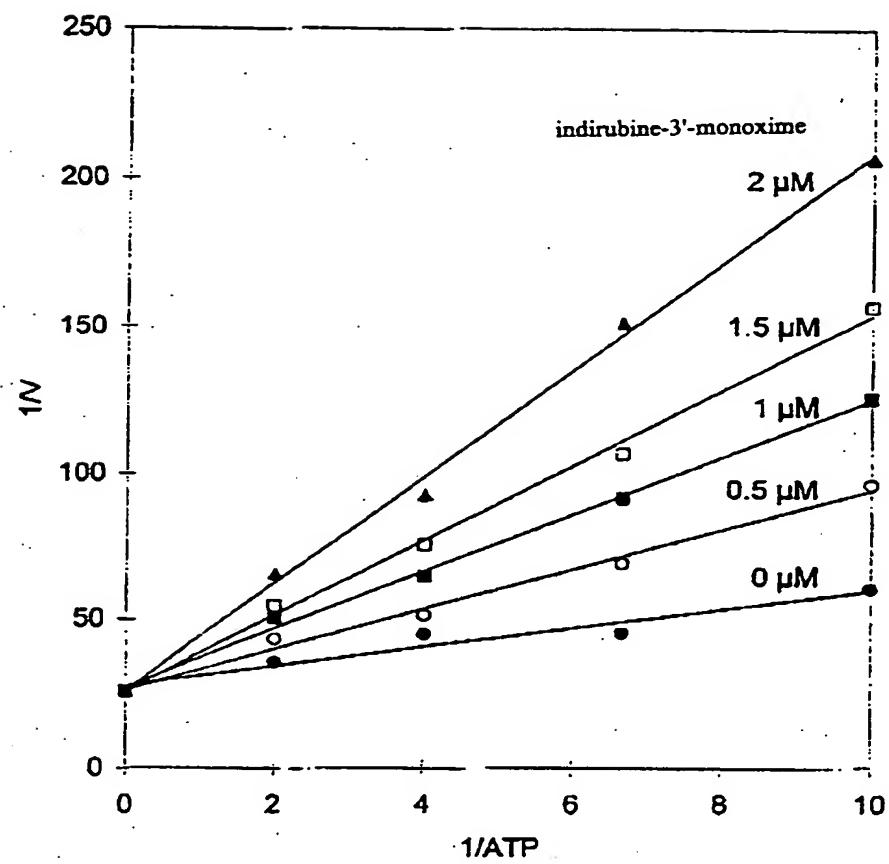
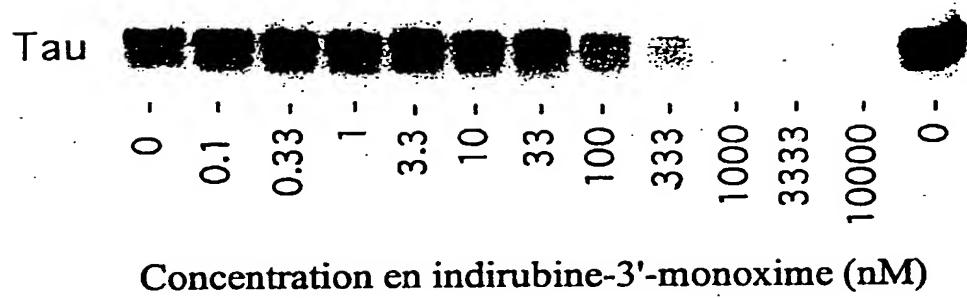


FIGURE 2

In vitro - GSK3**FIGURE 3A**

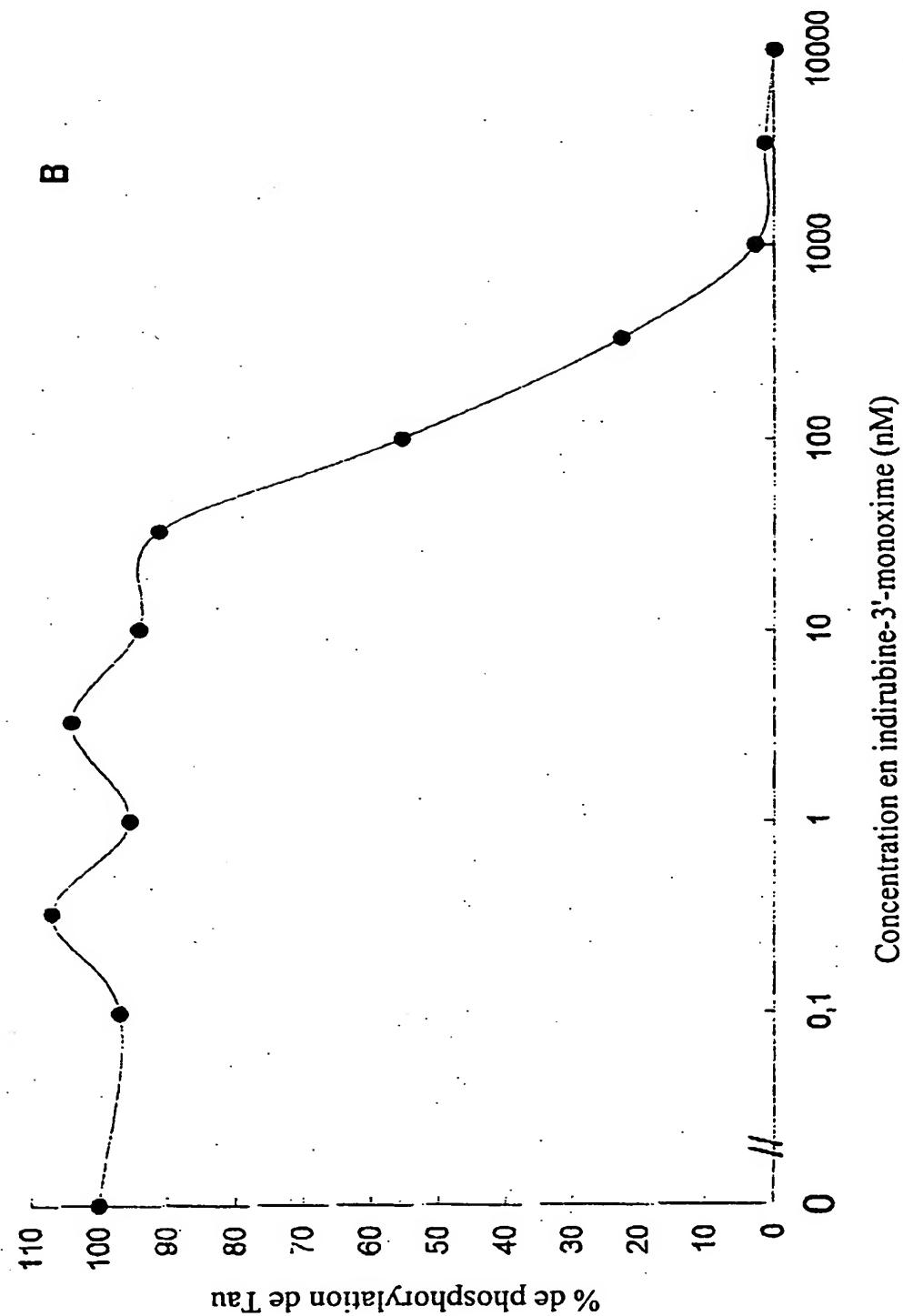


FIGURE 3B

Concentration en indirubine-3'-monoxime (nM)

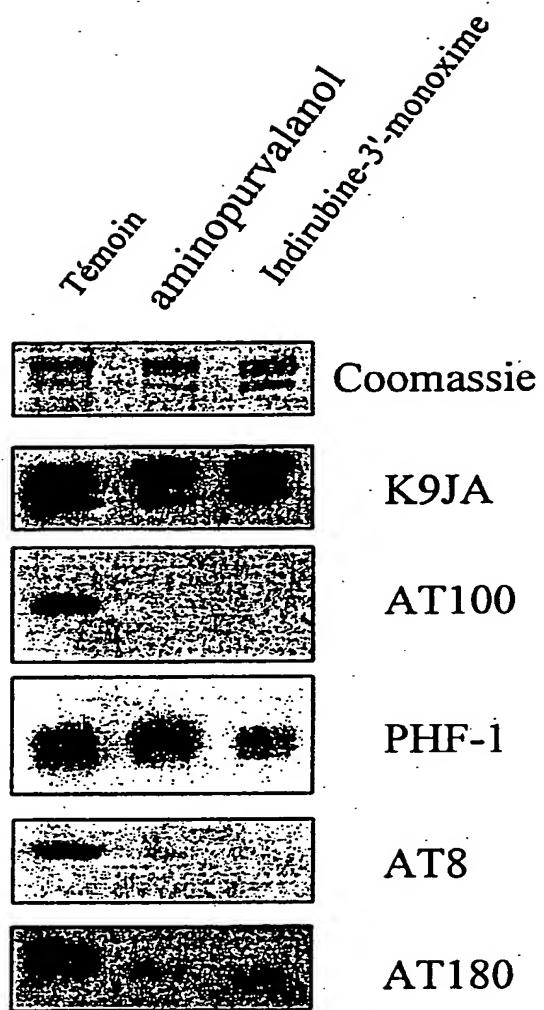


FIGURE 3C

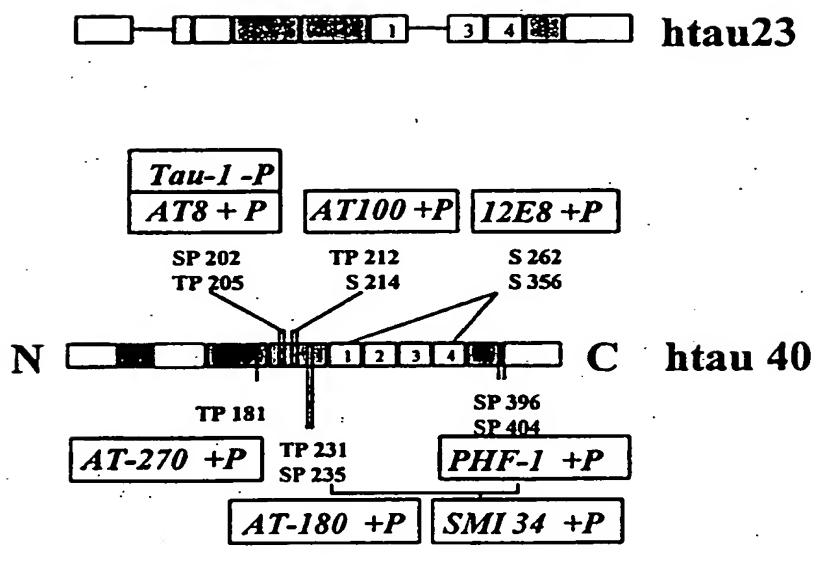


FIGURE 3D

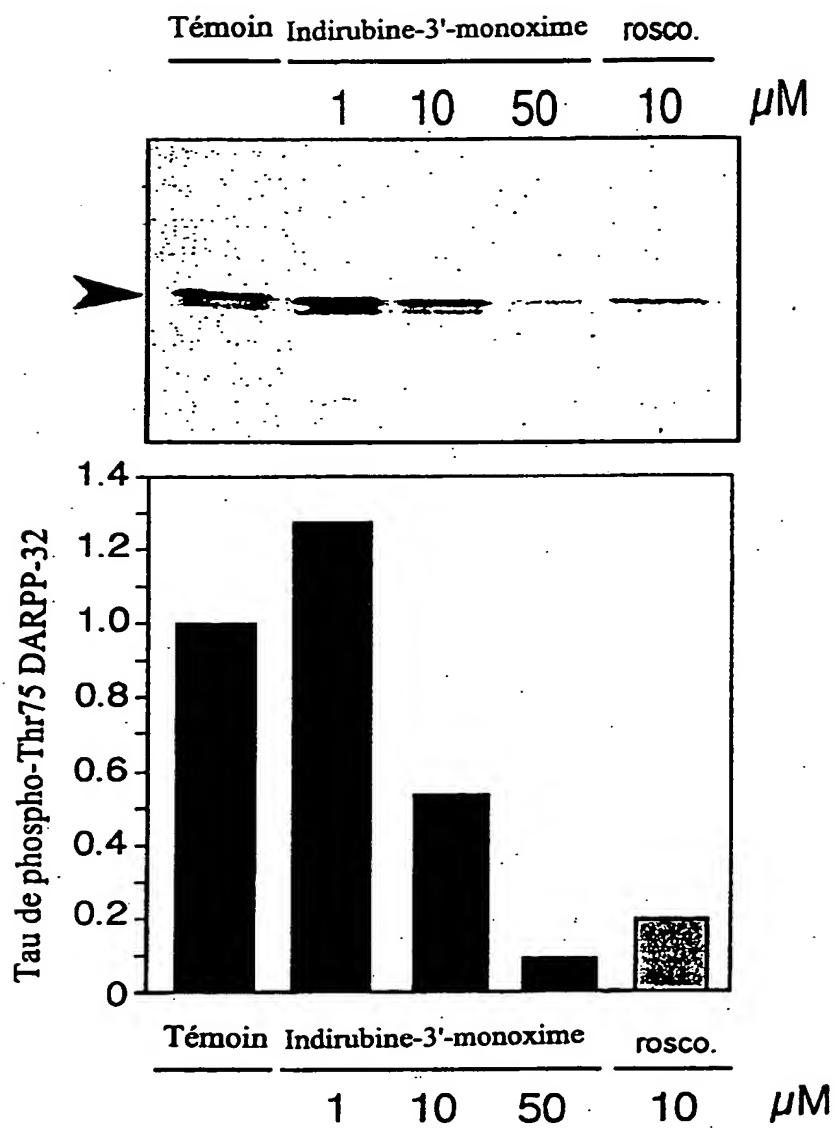


FIGURE 4

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
31 mai 2001 (31.05.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/37819 A3

- (51) Classification internationale des brevets⁷ :
A61K 31/404, 31/00, A61P
39/00, 3/10, 25/28, 31/10, 33/00, 35/00
- [FR/FR]; C.N.R.S., Station Biologique, B.P. 74, F-29682 Roscoff (FR).
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR00/03264
- (22) Date de dépôt international :
23 novembre 2000 (23.11.2000)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
99/14749 23 novembre 1999 (23.11.1999) FR
- (71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).
- (71) Déposant et
- (72) Inventeur : EISENBRAND, Gerhard [DE/DE]; Gustav-Kirchhoff-strasse 3, 69126 Heidelberg (DE).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : MEIJER, Laurent [FR/FR]; 16, rue de Bir Hakeim, F-29680 Roscoff (FR). HOESSEL, Ralph [DE/DE]; Erlenbacher Strasse 128, 67659 Kaiserslautern (DE). THOMMET, Andréa
- (74) Mandataires : PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet Armengaud Ainé, 3, Avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).
- (81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 13 juin 2002

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

A3

WO 01/37819

(54) Title: USE OF INDIRUBINE DERIVATIVES FOR MAKING MEDICINES

(54) Titre : UTILISATION DE DERIVES D'INDIRUBINE POUR LA FABRICATION DE MEDICAMENTS

(57) Abstract: The invention concerns the use of indirubine derivatives for making medicines inhibiting GSK-3β. The invention is useful for treating pathologies involving GSK-3β and CDK5.

(57) Abrégé : L'invention vise l'utilisation pour la fabrication de médicaments inhibiteurs de la GSK-3β de dérivés d'indirubine. Application pour le traitement de pathologies impliquant GSK-3β et CDK5.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/03264

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7	A61K31/404	A61K31/00	A61P39/00	A61P3/10	A61P25/28
	A61P31/10	A61P33/00	A61P35/00		

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, EMBASE, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	EP 0 966 963 A (EISENBRAND G., CNRS) 29 December 1999 (1999-12-29) cited in the application the whole document ---	1,4-15
A	HOESSEL R ET AL: "INDIRUBIN, THE ACTIVE CONSTITUENT OF A CHINESE ANTILEUKAEMIA MEDICINE, INHIBITS CYCLIN-DEPENDENT KINASES" NATURE CELL BIOLOGY, MACMILLAN PUBLISHERS, GB, vol. 1, no. 1, 1 May 1999 (1999-05-01), pages 60-67, XP000856197 ISSN: 1465-7392 cited in the application the whole document ---	1,4-12, 15 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 September 2001

Date of mailing of the international search report

25/09/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gac, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/03264

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages.	Relevant to claim No.
A	MEIJER L. ET AL: "Properties and potential applications of chemical inhibitors of cyclin-dependent Kinases." PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, (1999) 82/2 (279-284)., XP000938154 the whole document	1,5,6, 10,12,15
A	GRAY N ET AL: "ATP-SITE DIRECTED INHIBITORS OF CYCLIN-DEPENDENT KINASES" CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS BV, BE, vol. 6, no. 9, September 1999 (1999-09), pages 859-875, XP000856195 ISSN: 0929-8673 page 861, right-hand column, paragraphs 2,3 page 865, right-hand column page 871, column D, paragraphs 2-5	1,5,6, 10,12,15
A	WO 97 41854 A (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 13 November 1997 (1997-11-13) the whole document	1,13-15
P,X	MEIJER L.: "Cyclin-dependent kinases inhibitors as potential anticancer, antineurodegenerative, antiviral and antiparasitic agents." DRUG RESISTANCE UPDATES, (2000) 3/2 (83-88)., XP000931278 the whole document	1,5,6, 10,12,15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 00/03264

Follow-up of Box II

Claims nos: 2, 3

Claims 1, 4-8, 10, 11, 13-15 of the present application concern a very wide variety of compounds. However, a support basis as defined by PCT Article 6 and/or a disclosure as defined by PCT Article 5 can only be found for a very limited number of said claimed compounds. In the present case, the claims are lacking in support basis to such an extent that the disclosure of the invention is so limited that it is not possible to carry out any meaningful search covering the whole claimed spectrum. Consequently, the search was limited to those parts of the claims which are supported and disclosed, that is the parts concerning the compounds of Claims 9 and 12.

It is to be noted that the mere disclosure of the synthesis of compounds known per se (pages 10-25) cannot in any case constitute a sufficient support basis for a therapeutic use of said compounds.

Similarly, the use of compounds "close" to those claimed as elements of comparison (indigo or isatin derivatives: Table 2 page 21) does not constitute a technical support basis for demonstrating the activity of the claimed compounds.

Furthermore, Claims 2 and 3 describe compounds whereof the chemical formulae are neither included in formula I (exceeding the definition of formula I), nor are they supported by examples or a description of specific compounds. Consequently, owing to that lack of support and concision as required by PCT Article 6, no search was carried out on those claims.

Claim 4 (and its dependent claims), although they widen the definition of formula I, can, however, be considered as an acceptable technical alternative of Claim 1 since it does not affect the general structure of the compounds and the common inventive concept of the application. It has therefore been included in the search, with the limitations mentioned above (concerning the chemical formulae supported by the examples and accurately described).

Moreover, Claim 15 has been searched in relation with the concept of Claim 1 (GSK-3b inhibitors) and not under its numerous specific aspects (various diseases/pathologies).

Conclusion

Claims completely searched: 9 and 12

Claims incompletely searched: 1, 4, 10, 11, 13-15

Claims not searched: 2 and 3

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or any under any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No	
PCT/FR 00/03264	

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
EP 966963	A 29-12-1999	EP AU BR WO EP NO	0966963 A1 4368799 A 9910810 A 9962503 A2 1079826 A2 20006027 A	29-12-1999 20-12-1999 13-02-2001 09-12-1999 07-03-2001 22-01-2001
WO 9741854	A 13-11-1997	AU EP WO	2819397 A 1019043 A1 9741854 A1	26-11-1997 19-07-2000 13-11-1997

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Inde Internationale No
PCT/FR 00/03264

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE					
CIB 7 A61K31/404 A61K31/00 A61P39/00 A61P3/10 A61P25/28 A61P31/10 A61P33/00 A61P35/00					
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB					
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE					
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 A61K C07D					
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche					
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) CHEM ABS Data, EMBASE, EPO-Internal					
C. DOCUMENTS CONSIDERÉS COMME PERTINENTS					
Catégorie *		Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents			no. des revendications visées
P, A		EP 0 966 963 A (EISENBRAND G., CNRS) 29 décembre 1999 (1999-12-29) cité dans la demande le document en entier			1, 4-15
A		HOESSEL R ET AL: "INDIRUBIN, THE ACTIVE CONSTITUENT OF A CHINESE ANTILEUKAEMIA MEDICINE, INHIBITS CYCLIN-DEPENDENT KINASES" NATURE CELL BIOLOGY, MACMILLAN PUBLISHERS, GB, vol. 1, no. 1, 1 mai 1999 (1999-05-01), pages 60-67, XP000856197 ISSN: 1465-7392 cité dans la demande le document en entier			1, 4-12, 15
					-/-
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe			
<p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <ul style="list-style-type: none"> *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*&* document qui fait partie de la même famille de brevets</p>					
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée			Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale		
17 septembre 2001			25/09/2001		
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016			Fonctionnaire autorisé Gac, G		

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 00/03264

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	MEIJER L. ET AL: "Properties and potential applications of chemical inhibitors of cyclin-dependent Kinases." PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, (1999) 82/2 (279-284)., XP000938154 le document en entier	1,5,6, 10,12,15
A	GRAY N ET AL: "ATP-SITE DIRECTED INHIBITORS OF CYCLIN-DEPENDENT KINASES" CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS BV, BE, vol. 6, no. 9, septembre 1999 (1999-09), pages 859-875, XP000856195 ISSN: 0929-8673 page 861, colonne de droite, alinéas 2,3 page 865, colonne de droite page 871, colonne D, alinéas 2-5	1,5,6, 10,12,15
A	WO 97 41854 A (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 13 novembre 1997 (1997-11-13) le document en entier	1,13-15
P,X	MEIJER L.: "Cyclin-dependent kinases inhibitors as potential anticancer, antineurodegenerative, antiviral and antiparasitic agents." DRUG RESISTANCE UPDATES, (2000) 3/2 (83-88)., XP000931278 le document en entier	1,5,6, 10,12,15

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Revendications nos.: 2,3

Les revendications 1,4-8,10,11,13-15 présentes ont trait à une très grande variété de composés. Un fondement au sens de L'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT ne peut cependant être trouvé que pour un nombre très restreint de ces composés revendiqués. Dans le cas présent, les revendications manquent à un tel point de fondement et l'exposé de l'invention dans la description est si limité qu'une recherche significative couvrant tout le spectre revendiqué est impossible. Par conséquent, la recherche a été limitée aux parties des revendications qui présentent un fondement et un exposé, c'est à dire les parties ayant trait aux composés des revendications 9 et 12.

Il est à noter que le simple exposé de la synthèse de composés connus en soi (page 10-25) ne peut en aucun cas constituer un support suffisant pour une utilisation thérapeutique de ces composés.

De même, l'utilisation de composés "voisins" de ceux revendiqués comme éléments de comparaison (dérivés d'indigo ou d'isatine : Tableau 2 page 21) ne constitue pas un support technique pour démontrer l'activité des composés revendiqués.

D'autre part, les revendications 2 et 3 décrivent des composés dont les formules chimiques ne sont ni incluses dans la formule I (outrepassent la définition de la formule I), ni ne sont supportées par des exemples ou une description de composés spécifiques. Par conséquent, du au manque de support et de concision requis par l'Article 6 du PCT, aucune recherche n'est effectuée sur ces revendications.

La revendication 4 (et ses revendications dépendantes), bien qu'élargissant la définition de la formule I, peut toutefois être considérée comme une variante technique acceptable de la revendication 1 car elle n'atteste pas à la structure générale des composés et au concept inventif commun de la demande. Elle a donc été incluse dans la recherche, avec toutefois les limitations précédemment indiquées (concernant les formules chimiques supportées par des exemples et précisément décrites).

Par ailleurs, la revendication 15 a été cherchée en relation avec le concept de la revendication 1 (inhibiteurs de la GSK-3b) et non sous ses multiples aspects spécifiques (diverses maladies/pathologies) indépendamment.

Conclusion:

revendications entièrement recherchées: rev. 9 et 12
revendications incomplètement recherchées: rev. 1,4-8,10,11,13-15
revendications non recherchées: rev. 2 et 3.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Cinquième Internationale No PCT/FR 00/03264	
--	--

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 966963	A 29-12-1999	EP 0966963 A1 AU 4368799 A BR 9910810 A WO 9962503 A2 EP 1079826 A2 NO 20006027 A	29-12-1999 20-12-1999 13-02-2001 09-12-1999 07-03-2001 22-01-2001
WO 9741854	A 13-11-1997	AU 2819397 A EP 1019043 A1 WO 9741854 A1	26-11-1997 19-07-2000 13-11-1997